

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Lucie Vodolánová

Bakteriom stolice při terapii dětských neinfekčních onemocnění
The stool bacteriome during therapy for paediatric non-infectious diseases

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 22. 04. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí zázemí, materiálu a odborných rad k vypracování této diplomové práce. Velké poděkování patří také MUDr. Jakubu Hurychovi, který má celou studii včetně organizace a náboru pacientů na starosti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky ve FN Motol za podporu a pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Střevní mikrobiota je složena až ze 100 bilionů mikroorganismů, z nichž majoritní zastoupení mají bakterie. Její složení se mění v průběhu celého života a ovlivňuje vývoj imunitního systému, obranyschopnost proti patogenům, výživu hostitele, syntézu vitamínů či ukládání tuků. Některé studie poukazují na spojení mezi složením mikrobioty a vznikem zánětlivých střevních onemocnění. Jednou z možností léčby je terapie anti-TNF α protilátkami, které vychytávají nebo antagonizují cytokin TNF α , který mediuje zánět ve střevní sliznici.

Cílem této práce bylo zjistit, jak tato léčba ovlivňuje složení střevního bakteriomu u dětských pacientů s Crohnovou chorobou, a najít konkrétní bakteriální taxony, jejichž četnost se při léčbě mění. Analýzou složení bakteriomu dětských pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou jsem chtěla zjistit, jestli tato změna v zastoupení taxonů je specifická pro Crohnovu chorobu (jedná-li se o terapeuticky indukovanou restituci střeva) nebo jde o obecný důsledek terapie anti-TNF α . Pro stanovení „zdravého“ bakteriomu sloužily paralelně vzorky stolic od zdravých dětí. Složení bakteriomu bylo stanoveno profilováním analýzou variabilní oblasti V4 genu pro 16S rDNA ze vzorků stolic pacientů a kontrol pomocí sekvenování nové generace. Získaná data byla bioinformaticky analyzována.

Pacienti s Crohnovou chorobou měli jiné relativní složení bakteriomu v porovnání se zdravými dětmi a pacienty s juvenilní idiopatickou artritidou a toto složení se s terapií měnilo. Bakteriomy získané ze vzorků stolic pacientů s Crohnovou chorobou vykazovaly rozdílnou míru alfa diverzity, která klesala po podání léčby anti-TNF α . V jejich bakteriomu bylo vyšší zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (především rodu *Escherichia*) a rodů *Veillonella* a *Blautia*, které se po terapii ještě zvyšovalo. Jejich Pacienti s juvenilní idiopatickou artritidou vykazovali podobné relativní složení bakteriomu jako zdravá kontrolní skupina a vliv léčby anti-TNF α u této skupiny pacientů nelze z dosavadních výsledků posoudit. Studie, jejíž součástí byla tato práce, stále pokračuje, a proto se tedy jedná o předběžné výsledky.

Klíčová slova: bakteriom, stolice, Crohnova choroba, terapie anti-TNF α , 16S rDNA profilování

Abstract

The intestinal microbiota is composed of up to 100 trillion microorganisms of which bacteria are overwhelming majority. The microbiota affects the development of the immune system, defence against pathogens, host nutrition, vitamin synthesis or fat storage and its composition is changing throughout life. Some studies point to an association between microbiota composition and the development of inflammatory bowel disease. One of the treatment options is anti-TNF α antibodies therapy, which uptake or antagonize the TNF α cytokine that otherwise mediates inflammation in the intestinal mucosa.

The aim of the thesis was to examine how this treatment affects the composition of the intestinal bacteriome in paediatric patients with Crohn's disease, and to find specific bacterial taxa, whose abundance changes during the treatment. By inclusion of patients with juvenile idiopathic arthritis, also treated with anti-TNF α , the study aims to discern specific effects of therapeutically induced intestinal restitution (observable in patients with Crohn's disease) from general effects of anti-TNF α therapy. Stool samples from healthy children were used to determine "healthy" bacteriome. The composition of the bacteriome was studied by profiling the variable region of the V4 gene of 16S rDNA from patients stool samples and healthy controls using next generation sequencing. The obtained profiles were analysed using *vegan* and *phyloseq* tools in the R programming environment.

Patients with Crohn's disease had a different relative composition of the bacteriome as compared to healthy children and patients with juvenile idiopathic arthritis. Patients with Crohn's disease showed differences of alpha diversity, which is decreased after anti-TNF α treatment. Their bacteriomes more *Enterobacteriaceae* family and *Veillonella*, *Blautia* and *Escherichia* genus. This clade also increased upon the anti-TNF α therapy. Patients with juvenile idiopathic arthritis had a similar relative composition of the bacteriome as healthy control group. The effect of anti-TNF α treatment on the intestinal bacteriome in patients with juvenile idiopathic arthritis can't be presently assessed. The study is still ongoing, so these are a preliminary results.

Key words: bacteriome, stool, Crohn's disease, anti-TNF α therapy, 16S rDNA profiling

Obsah

1	Úvod	8
2	Přehled literatury	10
2.1	Crohnova choroba	10
2.1.1	Faktory vzniku onemocnění	10
2.1.2	Imunopatogeneze.....	11
2.1.3	Klasifikace a příznaky onemocnění	12
2.1.4	Diagnostika.....	13
2.1.5	Léčba	14
2.1.5.1	Biologická léčba protilátkami anti-TNF α	16
2.2	Juvenilní idiopatická artritida.....	18
2.2.1	Klasifikace a příznaky onemocnění	18
2.2.2	Faktory ovlivňující vznik onemocnění.....	19
2.2.3	Patogeneze.....	20
2.2.4	Diagnostika.....	20
2.2.5	Léčba	21
2.2.5.1	Biologická léčba	21
2.3	Mikrobiom.....	23
2.3.1	Střevní bakteriom	23
2.3.1.1	Střevní bakteriom u Crohnovy choroby	25
2.3.2	16S rRNA.....	27
3	Cíle práce.....	29
4	Materiál.....	30
4.1	Seznam použitých chemikálií	30
4.1.1	Chemikálie.....	30
4.1.2	Komerční kity.....	30

4.1.3	Primery a sondy	31
4.1.3.1	Kvantifikace úseku V4 16S rDNA po izolaci	31
4.1.3.2	Amplifikace fragmentů V4 16S rDNA a jejich indexování	31
4.1.4	Mock komunity	35
4.2	Přístroje	35
4.3	Vzorky stolic od dětských pacientů.....	36
5	Metody	38
5.1	Izolace DNA.....	38
5.2	Real-time PCR.....	38
5.3	Příprava sekvenační knihovny.....	39
5.3.1	PCR – připojení indexů	40
5.3.2	Ekvalizace PCR produktů v knihovně.....	42
5.3.2.1	Purifikace AMPure XP a KAPA qPCR.....	42
5.3.2.2	SequalPrep	43
5.4	Sekvenování nové generace – Illumina MiSeq	44
5.5	Bioinformatická analýza.....	47
6	Výsledky	49
6.1	Kontrolní body při přípravě sekvenačních knihoven	49
6.2	Bioinformatická analýza dat.....	57
6.3	Alfa diverzita	57
6.4	Beta diverzita.....	66
6.5	Relativní zastoupení konkrétních taxonů	68
7	Diskuse	75
8	Souhrn.....	81
9	Seznam použité literatury	82

Seznam zkratek

CD	Crohnova choroba (z angl.. Crohn's disease)
CDED	z angl. Crohn's Disease Exclusion Diet
CRP	C-reaktivní protein
HLA	lidský leukocytární antigen (z angl. Human Leukocyte Antigen)
IBD	zánětlivá onemocnění střev (z angl. Inflammatory Bowel Disease)
IL	interleukin
ILAR	z angl. International League of Associations of Rheumatologists
JADAS	z angl. Juvenile Arthritis Disease Activity Score
JIA	juvenilní idiopatická artritida
mTNF	membránový tumor necrosis factor
OTU	z angl. Operational Taxonomic Unit
pCDAI	index aktivity Crohnovy choroby u dětí (z angl. pediatric Crohn's Disease Activity Index)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. Short Chain Fatty Acid)
TNF	z angl. Tumor Necrosis Factor
TNFR	receptor pro tumor necrosis factor

1 Úvod

Střevní mikrobiota tvoří nejrozsáhlejší a nejrozmanitější mikrobiom v lidském těle. Skládá se z bakterií, virů, jednobuněčných parazitů, kvasinek a archea. Jeho složení se mění v průběhu celého života. Má významný vliv na imunitní systém, obranu proti patogenům, vliv na psychiku, výživu hostitele, syntézu vitamínů či ukládání tuků. Mnohé studie naznačují roli mikrobiomu v patogenezi různých onemocnění. Jedním z nich je například Crohnova choroba. Studium mikrobiomu je důležité pro pochopení etiologie a patogenese onemocnění s potenciálem co nejvíce cílit terapeutické zásahy a predikovat vznik onemocnění.

Crohnova choroba je chronické zánětlivé neinfekční onemocnění postihující primárně gastrointestinální trakt. U dětských pacientů jsou typickými příznaky bolesti břicha, průjemy, úbytek na váze, únava či opožděný růst. Přesná etiologie není známá, ale pravděpodobně se jedná o nepřiměřenou imunitní reakci organismu u geneticky predisponovaných jedinců v souvislosti s dysbiózou mikrobiomu. Při analýze jeho složení je zřejmý pokles diverzity mikrobiomu oproti zdravým jedincům. Pacienti s těžkými symptomy, kteří nereagují na jinou léčbu, podstupují biologickou terapii na bázi protilátek proti cytokinu TNF α . Vlivem této léčby u reagujících pacientů se mění složení jejich mikrobiomu směrem k jeho zdravé podobě.

Juvenilní idiopatická artritida je revmatické onemocnění postihující klouby chronickým zánětem. Onemocnění nepostihuje trávicí soustavu. U těžkých průběhů nemoci či pacientů nereagujících na jinou léčbu se přistupuje k terapii protilátkami anti-TNF α .

Cílem této diplomové práce je charakterizovat složení bakteriomu ze stolic dětských pacientů s Crohnovou chorobou a definovat změny v jeho složení vlivem terapie anti-TNF α . Dále bych chtěla najít bakteriální taxony, jejichž zastoupení se specificky mění vlivem terapeuticky indukované restituce střeva a nejedná se o obecný vliv terapie těmito protilátkami. K získání těchto informací bude složení bakteriomu pacientů s CD užívajících léčbu anti-TNF α porovnáváno se střevním bakteriomem pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou, kteří podstupují terapii stejnými protilátkami. Pro stanovení „zdravého“ bakteriomu budou analyzovány vzorky stolic od zdravých dětí.

Složení bakteriomu bude identifikováno analýzou variabilní oblasti V4 genu 16S rDNA ze vzorků stolic pacientů a kontrol pomocí sekvenování nové generace na platformě Illumina Miseq. Získaná data budou bioinformaticky zpracována a vyhodnocována.

2 Přehled literatury

2.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé neinfekční onemocnění postihující primárně gastrointestinální trakt, pro nějž je charakteristický segmentální granulomatózní transmurální zánět střevní stěny. Spolu s ulcerózní kolitidou tvoří jeden pól tzv. zánětlivých střevních onemocnění (IBD). Nemoc může postihovat všechny části trávicího traktu, nejčastěji však konec tenkého střeva a tlusté střevo (Torres et al. 2017).

Incidence CD se za posledních třicet let výrazně zvýšila. V Evropě se pohybuje mezi 0,8 až 13,0 nových pacientů na 100 000 obyvatel za rok (Ng et al. 2017). Nejčastěji onemocní mladí lidé ve věku 10 až 40 let. Průměrný věk stanovení diagnózy u dětských pacientů se pohybuje kolem 12 roku (Hovde and Moum 2012; Sandhu et al. 2010).

2.1.1 Faktory vzniku onemocnění

Přesná příčina vzniku Crohnovy choroby není stále známa, mezi hlavní rizikové faktory patří genetické predispozice, výživa, infekce, antibiotická léčba a životní styl. Jedním z nejvýznamnějších patogenetických faktorů je ale patrně střevní dysmikrobie (porucha rovnováhy v zastoupení mikroorganismů ve střevní mikroflóře), která vyvolává nepřiměřenou reakci imunitního systému u citlivých jedinců.

Rodinnou predispozici udává až 12 % pacientů s CD (Moller et al. 2015). Díky celogenomovým asociačním studiím bylo odhaleno 37 genů, jejichž varianty jsou asociovány se vznikem Crohnovy choroby. Tyto varianty často souvisejí s funkcí imunitního systému, resp. s přehnanou odpovědí T-buněk na interakci s bakteriemi na střevní sliznici (například PTPN22, NOD2, TNFSF18, ATG16L1 a další) (Jostins et al. 2012).

Pozitivní vliv pro pacienta v souvislosti se vznikem a průběhem onemocnění má vysoký podíl vlákniny ve stravě. Podle studie na více než 1100 subjektech s CD se ukazuje, že jedinci přijímající stravu s vyšším obsahem vlákniny (v průměru 23 g/den) měli o 40 % nižší riziko relapsu onemocnění, než jedinci, kteří jedli stravu chudou na vlákninu (Brotherton et al. 2016).

V posledních letech se zkoumá vliv střevní mikrobioty na rozvoj onemocnění. Více o tomto tématu bude diskutováno v kapitole 2.3.

2.1.2 Imunopatogeneze

Přesný mechanismus patogeneze u IBD není známá. Obecně se dá říci, že se jedná o silnou reakci imunitního systému na fyziologickou střevní mikrobiotu u geneticky predisponovaných jedinců. Není ale jasné, jestli je příčinou porucha imunitního systému nebo i jiné složení střevní mikrobioty oproti zdravým jedincům (Strober et al. 2007).

Imunitní systém ve střevní sliznici je neustále v kontaktu s bakteriálními antigeny střevní mikrobioty. Střevní sliznice je u zdravého jedince chráněná před působením mikroorganismů silnou vrstvou hlenu, která nejenže brání styku se sliznicí, ale obsahuje i řadu antimikrobiálních látek produkovaných tzv. Panethovými buňkami střevního epitelu. Dalšími specializovanými epitelovými buňkami jsou tzv. M-buňky, které transportují mikrobiální antigeny do sliznice. Zde buňky prezentující antigen (dendritické buňky a makrofágy) předkládají antigen T a B lymfocytům. Naivní Th0 buňky se diferencují na Th1, Th2, Th17 a regulační Treg buňky. U zdravých jedinců Treg buňky a protizánětlivé cytokiny regulují funkci ostatních T buněk a zamezují rozvoji nadměrné imunitní reakce (Torres et al. 2017; Wallace et al. 2014).

V patogenezi IBS se má za to, že aktivované makrofágy a lymfocyty Th1 a Th17 reagují abnormální produkcí prozánětlivých cytokinů jako jsou interleukiny a TNF α (tumor necrosis faktor). Treg buňky a protizánětlivé cytokiny nedokáží tak silnou prozánětlivou reakci regulovat (Ahluwalia et al. 2018; Wallace et al. 2014). Rozvíjí se tak chronický zánět, který je dlouhodobě udržován dysbiózou střevní mikrobioty, dalším zvyšováním propustnosti střevního epitelu a silnou reakcí buněk imunitního systému. Jestli je prvotní příčinou vzniku onemocnění složení střevní mikrobioty nebo varianty genů pro součásti imunitního systému, je stále předmětem zkoumání.

Jako další mechanismus byla u pacientů s CD zjištěna snížená exprese některých mucinových genů, což zapříčiňuje poruchu v produkci hlenu ochraňující střevní sliznici. Dochází tak k přístupnosti střevní sliznice patogenům, což přispívá v rozvoji onemocnění (Buisine et al. 1999). Vliv má také zvýšení prostupnosti epiteliální vrstvy oslabením těsných spojů mezi epitelovými buňkami. Bakterie pak mají možnost snadněji prostupovat do sliznice a indukovat imunitní reakci (Wallace et al. 2014).

2.1.3 Klasifikace a příznaky onemocnění

Crohnova choroba je nespecifické, chronické, neinfekční onemocnění charakteristické segmentálním, transmurálním a granulomatózním zánětem střevní stěny, které může postihovat celou trávicí soustavu. Jsou pro něj typické období remisí a relapsů. Onemocnění je charakterizováno podle tzv. Montrealské klasifikace, která zohledňuje věk pacienta při stanovení diagnózy, lokalizaci postižení trávicí trubice a chování nemoci (

Tab. 1). Lokalizace a chování onemocnění se časem mění a dokážeme na jejich základě predikovat další vývoj (Satsangi et al. 2006).

Tab. 1: Montrealská klasifikace Crohnovy choroby; modifikátor L4 lze připojit k L1-L3, modifikátor p lze přidat k B1-B3 (Satsangi et al. 2006).

Montrealská klasifikace		modifikátory
A – věk v době diagnózy	A1 < 16 let A2 17-40 let A3 > 40 let	
L - lokalizace	L1 terminální ileum L2 tlusté střevo L3 ileum a tlusté střevo	L4 – izolované postižení horní části GIT
B - chování	B1 nestenózující – neperforující B2 stenózující B3 perforující	p – perianální postižení

Aktivita onemocnění u dětí je hodnocena na základě indexu aktivity pCDAI (pediatric Crohn's disease activity index). Hodnota pCDAI < 10 charakterizuje onemocnění v remisi, tedy klidové fázi, kdy pacient nepociťuje příznaky. U CD je dále rozlišován mírný (pCDAI 10-30) a těžký průběh (pCDAI 30-125). Aby se dalo hovořit o klinicky významné změně v aktivitě onemocnění, musí se hodnota pCDAI zvýšit o 12,5 bodu (Hyams et al. 2005).

V době stanovení diagnózy je zánět lokalizován ve 30 % případů v terminálním ileu a ve 20 % v oblasti tlustého střeva. V 50 % případů je postiženo jak terminální ileum, tak tlusté střevo. Zároveň až 25 % pacientů trpí komplikacemi v perianální oblasti (Cheifetz 2013).

Příznaky mohou být velmi různorodé a závisí na lokalizaci onemocnění. Při postižení terminálního ilea jsou hlavními příznaky bolesti břicha (typicky v oblasti pravého podbřišku), únava, úbytek na váze, průjem a malabsorpce živin. Při postižení tlustého

střeva jsou častější příměsi krve a/nebo hleny ve stolici a zácpa, mohou se objevit abscesy a píštěle v perianální oblasti. Extraintestinální projevy postihují kůži (erytema nodosum, pyoderma gangrenosum), oči (konjunktivida, uveitida, iritida), ústa (aftózní stomatitida) a klouby (artritida). Protože příznaky mohou být často dlouhodobé a mírné, může trvat i řadu let, než je stanovena diagnóza (Gabalec 2009; Mitrová 2012). U dětí jsou nejčastějšími příznaky bolesti břicha a nespecifické obtíže jako únava, letargie, anorexii, břišní dyskomfort, opožděný růst či nižší konečná výška v dospělosti a opožděná puberta (Sandhu et al. 2010).

2.1.4 Diagnostika

Diagnóza je stanovena na základě anamnézy, fyzikálního a laboratorního vyšetření a výsledků ze zobrazovacích technik, endoskopického a histologického vyšetření.

V rámci anamnézy a fyzikálního vyšetření se pátrá po příznacích onemocnění, jako jsou bolesti břicha, neprospívání, úbytek na váze, charakter a přítomnost příměsí ve stolici (krev a/nebo hlen), opoždění růstu u dětských pacientů apod. Důležité jsou také údaje o délce trvání příznaků a výskytu onemocnění v rodině (Mitrová 2012; Stange et al. 2006).

Laboratorní vyšetření krve by mělo obsahovat krevní obraz, C-reaktivní protein (CRP), rychlost sedimentace erytrocytů, jaterní testy a stanovení hladiny albuminu. Krevní obraz (zejména hodnoty hemoglobinu) mohou ukázat na anemii, která je častá u pacientů s CD. Hodnoty CRP, rychlosti sedimentace erytrocytů a albuminu vypovídají o závažnosti zánětu a tedy i o aktivitě onemocnění. Jejich pravidelným sledováním je možné hodnotit reakci na léčbu a předpovídat průběh onemocnění (Gajendran et al. 2018; Mitrová 2012; Stange et al. 2006). Stolicе se testuje na přítomnost biomarkerů kalprotektinu a laktoferinu. Jedná se o proteiny produkované leukocyty, které nejsou degradovány enzymy v tlustém střevě, a proto jejich koncentrace ve stolici koreluje s množstvím aktivních leukocytů ve střevní sliznici (Sandhu et al. 2010; Wright et al. 2014). Abychom vyloučili průjmová onemocnění způsobená některým z infekčních patogenů, měla by být stolice testována na přítomnost toxinů A a B *Clostridioides (Clostridium) difficile*, kultivačně na *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a *Campylobacter jejuni* a dále na přítomnost parazitů *Entamoeba histolytica* a *Giardia lamblia* (IBD working group ESPGHAN 2005).

Sonografické vyšetření je používáno zejména k zobrazení jednotlivých střevních kliček a detekci zánětlivého infiltrátu; rentgenografie ke zjištění neprůchodnosti nebo perforace střeva (Mitrová 2012; Sandhu et al. 2010; Stange et al. 2006). Enterografie je zobrazovací metoda, při níž je do tenkého střeva aplikována kontrastní látka a následně pomocí magnetické resonance (ev. počítačové tomografie) můžeme sledovat stav lumen střeva jako přítomnost stenóz a píštělí. Dále nám poskytuje informace o zánětlivém stavu sliznice a abscesech (IBD working group ESPGHAN 2005; Stange et al. 2006).

Konečná diagnóza CD lze však určit až na základě endoskopického a následně histologického vyšetření. Obvykle se provádí endoskopie dolní části trávicí soustavy, kde je odebráno několik vzorků sliznice z různých míst terminálního ilea a tlustého střeva (Stange et al. 2006). Typickým endoskopickým obrazem u CD je zarudnutí sliznice, vředy a charakteristický dlaždicovitý reliéf sliznice (tzv. cobblestones) (Gabalec 2009; Stange et al. 2006).

2.1.5 Léčba

Neexistuje lék, který by pacienty s CD zcela vyléčil. V indukční fázi je cílem navození remise onemocnění. Udržovací léčba má za cíl zachovat onemocnění v remisi.

Existují dva přístupy indukční léčby:

- 1) **„Step-up strategie“** u níž se začíná od diet a slabších léků (enterální výživa, Crohn's disease exclusion diet, aminosalicyláty a další) po nejsilnější (imunosupresiva, biologická léčba),
- 2) **„Top-down strategie“** u níž se postupuje od biologické léčby ke slabším lékům (tato strategie se používá u těžkých případů s komplikacemi, malnutricí apod.) (Mitrová 2012).

Exkluzivní enterální výživa (EEV) je v současné době léčbou první volby hlavně u dětských pacientů. Navození remise při podávání EEV je udáváno u 60-80% případů. EEV se obvykle podává 6 týdnů a to buď formou drinků k popíjení nebo k aplikaci nazogastrickou sondou. Obvykle se podává 120% referenčního denního příjmu živin (Sandhu et al. 2010). Další možností je tzv. CDED (Crohn's disease exclusion diet). Jedná se o restriktivní dietu bohatou na vlákninu, jejíž základ je postaven na konzumaci převážně čerstvých potravin a průmyslově nezpracovaných potravin. Dieta je bohatá na ovoce

a zeleniny, dietní maso (kuřecí, hovězí a rybí), vejce a přílohy (rýže, brambory). Je zakázána konzumace mléčných výrobků, lepku, bezlepkového pečiva, živočišného tuku (máslo, sádlo apod.), zpracovaného a vepřového masa a konzerv. Dieta je často podávána v kombinaci s enterální výživou (Sigall-Boneh et al. 2014).

Při mírné formě nemoci mohou být použity aminosalicyláty. Účinnou látkou je 5-aminosalicylová kyselina (mesalazin) v kombinaci s přídatnými látkami v různých lékových formách (léky Sulfasalazin, Asacol, Salofalk). Lze je použít i v rámci udržovací léčby po chirurgickém zákroku. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří průjem, bolest hlavy, nauzea a vyrážka. Aminosalicyláty jsou volbou spíše u ulcerózní kolitidy. Existuje několik studií, které neprokazují žádné klinické účinky u CD ve srovnání s placebem (Gabalec 2009; Gomollón et al. 2017).

Kortikosteroidy jsou léčbou první volby hlavně u dospělých pacientů. Jejich nasazení je vhodné u střední až těžké formy CD. Obvykle používaný prednison lze nahradit novějším kortikoidem budesonidem, který je díky jeho lokálnímu účinku až ve střevě lépe snášen. Nežádoucí účinky kortikoidů jsou dlouho známy a zahrnují mimo jiné např. akné, poruchy spánku, deprese a poruchy glukózové intolerance. Kortikosteroidy nejsou vhodnou léčbou u dětí, protože při dlouhodobém užívání dochází k demineralizaci kostí a poruchám v syntéze pojivových tkání, které negativně ovlivňují růst (Bernstein et al. 1995; Gabalec 2009; Sandhu et al. 2010).

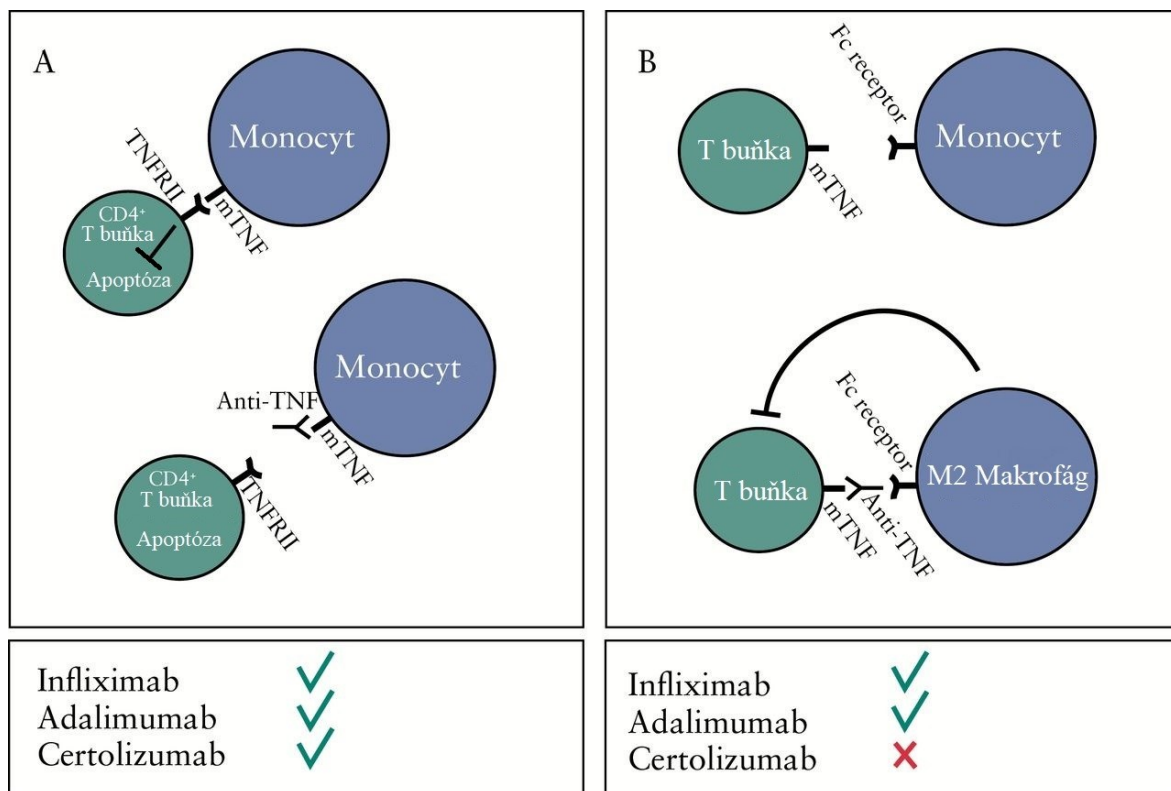
Mezi používaná imunosupresiva patří i azathioprin, jeho metabolit 6-merkaptopurin a metotrexát. Metotrexát je druhou volbou u dětských pacientů. Kromě perorálního užívání lze podávat i formou subkutánních injekcí pouze jednou týdně. Obvykle je dobře snášen, nežádoucí účinky jako nauzea, zvracení a průjem mohou být zmírněny při současném podávání kyseliny listové. Účinky léčby imunosupresivy bývají patrné až po 16 týdnech, proto se často podávají v kombinaci s jinými léky a také při udržovací terapii (Gabalec 2009; Gomollón et al. 2017; Sandhu et al. 2010).

2.1.5.1 Biologická léčba protilátkami anti-TNF α

2.1.5.1.1 Mechanismus působení

TNF (tumor necrosis factor) je cytokin produkovaný buňkami imunitního systému jako transmembránový protein (mTNF). Jeho extracelulární část je odštěpena enzymem konvertujícím TNF α za vzniku rozpustného TNF. Pro TNF existují dva receptory (TNFR I a TNFR II), které spouštějí rozdílné signalizační dráhy. Vazbou rozpustného TNF na receptor TNFR I může být aktivována signalizační dráha ovlivňující buněčnou smrt aktivací kaspázy-8 nebo rozvoj zánětu a degeneraci tkání vlivem NF- κ B a MAPK kináz. TNFR II je aktivován vazbou mTNF a jeho signalizační dráha rozvíjí kromě zánětu také regeneraci tkání a buněčnou proliferaci (Kalliolias a Ivashkiv 2016).

Podle dostupných studií existují dva hlavní mechanismy působení léčby založené na protilátkách anti-TNF α . Podle Atreya et al. (2011) protilátky anti-TNF α nepřímo indukují apoptózu T-buněk a tím snižují imunitní reakci organismu. Protilátka se váže na mTNF na makrofázích a zamezuje tak antiapoptické vazbě mTNF na receptor TNFR II na T-buňkách (Obr. 1A, str. 17). Takto fungují protilátky v léčích infliximab, adalimumab a certolizumab. Druhý mechanismus je popsán u protilátek obsahující Fc oblast, která se váže na Fc receptor na makrofázích. Protilátky anti-TNF α jsou adsorbovány na Fc receptor a váží se na mTNF na aktivovaných T-buňkách. Regulují tak proliferaci T-buněk a indukují diferenciaci makrofágů na tzv. M2 makrofágy, které regulují zánětlivou reakci a regenerují poškozené tkáně (Obr. 1B). Tímto způsobem fungují protilátky infliximab a adalimumab (Vos et al. 2011).



Obr. 1: Mechanismus působení protilátek anti-TNF α na buňky imunitního systému.

A. Inhibicí vazby mTNF – TNFR II je indukována apoptóza aktivovaných T-buněk a zmírnění zánětlivé reakce ve tkáních. Takto fungují léky infliximab, adalimumab a certolizumab. B. Protilátka anti-TNF α obsahující Fc oblast se váže mezi Fc receptor a mTNF. Inhibuje tím proliferaci T-buněk a indukuje diferenciaci makrofágu na formu M2, která reguluje zánět a podporuje hojení tkání. Takto fungují protilátky v přípravcích infliximab a adalimumab. Upraveno podle (Levin et al. 2016).

2.1.5.1.2 Terapie protilátkami anti-TNF α

Infliximab je chimérická (75% lidská a 25% myší) monoklonální protilátka anti-TNF α . Podává se ve formě intravenózních infuzí a to při zahájení a poté v 2. a 6. týdnu indukční léčby. V případě klinické odpovědi se pokračuje v podávání jedné dávky každých 8 týdnů. Udržovací léčba infliximabem může být kombinována s užíváním azathioprinu (Gabalec 2009; Gomollón et al. 2017).

Adalimumab je plně lidská monoklonální protilátka anti-TNF α . Podává se formou subkutánních injekcí jednou za dva týdny. Klinický účinek se dostaví do 16 týdnů od začátku léčby (Gomollón et al. 2017; Sandhu et al. 2010).

2.2 Juvenilní idiopatická artritida

Pro porovnání vlivu léčby anti-TNF α na složení střevního mikrobiomu budou výsledky pacientů s CD porovnávány s pacienty s juvenilní idiopatickou artritidou, tedy onemocněním nepostihující střevo, kteří užívají stejnou léčbu.

Juvenilní idiopatická artritida (JIA) je soubor onemocnění, která se projevují artritidou neznámého původu trvající minimálně 6 týdnů u pacientů do 16 let. Rozlišujeme sedm podtypů JIA, které se od sebe liší klinickými příznaky. V Evropě a Severní Americe se nejčastěji vyskytuje oligoartritida, zatímco na Kostarice, Novém Zélandu, v Indii a v Jižní Africe je častějším podtypem polyartritida (Ravelli and Martini 2007).

Podle souhrnné studie se incidence JIA pohybuje mezi 1,6 až 23 případů na 100 000 obyvatel za rok. Onemocnění postihuje dívky až dvakrát častěji než chlapce (Thierry et al. 2014).

2.2.1 Klasifikace a příznaky onemocnění

V současné době je juvenilní idiopatická artritida rozdělována do sedmi podtypů na základě klasifikace ILAR (International League of Associations of Rheumatologists) roku 1997 (Petty et al. 1998). Jsou jimi (v závorkách jsou uvedeny charakteristické příznaky):

- systémová forma (horečnaté stavy, vyrážka, polyartritida)
- oligoartikulární forma (artritidou postiženy max. čtyři klouby)
- polyartikulární forma (postižení pěti a více kloubů, dále rozdělena podle pozitivitivity revmatoidního faktoru)
- artritida spojená s entezitidou (zánět úponu šlach a vazů)
- psoriatická forma (psoriatická vyrážka, daktylitida)
- další artritická onemocnění nespádající do předchozích podtypů

Mezi příznaky společné pro všechny podtypy patří artritida velkých i malých kloubů v různém rozsahu. U systémové formy se může rozvinout život ohrožující syndrom aktivace makrofágů, který se projevuje horečkami, krvácením a poruchami centrálního nervového systému v důsledku nekontrolovatelného uvolnění cytokinů do krve (tzv. cytokinová bouře) (Barut et al. 2017; Ravelli and Martini 2007).

I přes snahu definovat na základě charakteristických příznaků a laboratorních hodnot jednotlivé podtypy JIA, klasifikace ILAR nerozlišuje toto onemocnění na zcela homogenní skupiny. Validace těchto klasifikačních kritérií je cílem několika vědeckých skupin a bylo vydáno již několik doporučení a revizí, které ale neposkytují jednoznačné rozdělení podtypů JIA (Ferrell et al. 2014; Martini et al. 2019; Petty et al. 2004)

V současné době se pro hodnocení aktivity nemoci JIA používá stupnice JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score). K hodnocení jsou použita tato čtyři kritéria:

- globální hodnocení aktivity nemoci lékařem (na stupnici 0 až 10, kdy 10 označuje maximální aktivitu)
- globální hodnocení aktivity nemoci rodičem / pacientem (na stupnici 0-10)
- počet kloubů s aktivním synovitidou
- rychlost sedimentace erytrocytů

Výsledkem je zařazení pacienta do jedné ze tří skupin:

- JADAS-10 při skóre 0-40 a postižení maximálně 10 kloubů,
- JADAS-27 při skóre 0-57 a postižením až 27 kloubů
- JADAS-71 se skóre 0-101 a synovitidou postihující až 71 kloubů (Consolaro et al. 2009).

Později došlo k úpravě tohoto hodnocení a k jeho zjednodušení za vzniku tzv. klinické verze JADAS (cJADAS), ve které byla vyřazena rychlost sedimentace erytrocytů jako kritérium k hodnocení aktivity nemoci (Consolaro et al. 2014).

2.2.2 Faktory ovlivňující vznik onemocnění

Přesná příčina onemocnění JIA není známá. Jedná se o typické multifaktoriální onemocnění, na jehož vznik má pravděpodobně vliv genetická predispozice jedince, předchozí prodělané infekce a další environmentální faktory.

Celogenomová asociační studie McIntosh et al. (2017), v rámci které byl analyzován genom 2 751 pacientů s JIA a necelých 16 000 zdravých kontrol, poskytla dosud nejkomplexnější informace o genech spojených s juvenilní idiopatickou artritidou. Mezi ně byly zahrnuty např. geny HLA, PTPN22 a PTPN2, STAT4 či geny pro IL-2.

Pravděpodobně sem patří i gen pro IL-6, jehož jedna varianta zapříčiňuje kolísavé hodnoty IL-6 a výskyt příznaků u systémové formy JIA. To potvrzuje i fakt, že systémová forma JIA dobře odpovídá na terapii monoklonální protilátkou proti IL-6 (Fishman et al. 1998; Yokota et al. 2005).

Potenciální roli v etiologii JIA mohou hrát prodělané infekce během raného věku dítěte. Mezi studovaná infekční agens patří například parvovirus B19 (Lehmann et al. 2003) či virus Epstein-Barr (Aghighi et al. 2007).

2.2.3 Patogeneze

Juvenilní idiopatická artritida je autoimunitní onemocnění, při kterém dochází u všech forem k otoku kloubů v důsledku nahromadění synoviální tekutiny a ztlustění synoviální výstelky v kloubu. Synoviální výstelka je bohatě pokrvená vlivem vysoké exprese angiogenního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Scola et al. 2001). Vysoce vaskularizovaná tkáň umožňuje buňkám imunitního systému, jako jsou neutrofily, makrofágy, dendritické buňky a T-buňky, cestovat do synovia a vyvolávat a udržovat zde zánět. Podobně jako u IBD i u JIA je porušena rovnováha mezi Th1 a Th2 buňkami ve prospěch Th1 buněk, které jsou do synovia specificky mobilizovány pomocí chemokinů. Stejně tak je i počet Treg buněk snížený. To má za následek zvýšenou produkci interleukinů IL-1 a IL-6 a TNF α (Van Kuijk et al. 2006; Silverman et al. 1993; Stelmaszczyk-Emmel et al. 2012; Wedderburn et al. 2000).

2.2.4 Diagnostika

JIA je tzv. diagnózou *per exclusionem*, tedy její stanovení je na základě vyloučení všech možných ostatních příčin pacientových příznaků (infekce, nádorové onemocnění, nemoci pojivových tkání a další). Diagnostika začíná fyzikálním vyšetřením a odběrem osobní a rodinné anamnézy pacienta (Giancane et al. 2016).

Laboratorním vyšetřením nedokážeme nemoc potvrdit, ale můžeme zjistit informace o zánětu v těle či genetických predispozicích. Testuje se zejména sedimentace erytrocytů, C-reaktivní protein, celkový krevní obraz, hladina sérového železa, revmatoidní

faktor a ANA protilátky. Z genetických predispozic se testuje hlavně pozitivita HLA-B27 (Giancane et al. 2016; Okamoto et al. 2019).

Zobrazovací techniky jako je radiografie, magnetická resonance či ultrasonografie umožňují získat informace o poškození kloubů a kostí. Mezi ně patří například synovitida, eroze kostí, destrukce chrupavek, výpotek synoviální tekutiny, zánět šlach, kloubní srůsty a další (Giancane et al. 2016).

2.2.5 Léčba

Podobně jako u Crohnovy choroby, neexistuje léčba, která by JIA zcela vyléčila. Cílem léčby je navození remise. Doporučená léčba pro jednotlivé podtypy se mírně odlišuje. Kromě medikamentózní léčby je vhodné zařazení pohybové fyzioterapie do procesu léčby. Jejím cílem je zachování či obnovení funkce kloubů a jejich pohybového rozsahu (Giancane et al. 2016).

Nesteroidní protizánětlivé léky jsou první volbou ještě v průběhu stanovení diagnózy a u pacientů s nízkou aktivitou nemoci a bez kloubních kontraktur. Tyto léky tlumí bolest a zmírňují zánět. Jejich užívání bez kombinace s jinými léky by neměla trvat déle než 2 měsíce, protože u systémové formy mohou přispívat k vývoji syndromu aktivace makrofágů (Bernstein et al. 1977; Beukelman et al. 2011; Havelka et al. 2004; Okamoto et al. 2019).

Další možností je užívání glukokortikoidů, a to buď systémově, nebo ve formě injekcí do postižených kloubů. Mezi používaná antirevmatika patří sulfasalazin a metotrexát (Okamoto et al. 2019).

2.2.5.1 Biologická léčba

V České republice je v současnosti k léčbě juvenilní idiopatické artritidy schváleno hned několik biologik, které se liší mechanismem účinku. Proti TNF α jsou to léky adalimumab a etanercept, proti interleukinu IL-1 je to canakinumab a anakinra a proti IL-6 tocilizumab. Biologika mířená proti interleukinům jsou indikována u systémové formy

JIA. Biologická léčba je indikována u pacientů neodpovídajících na jinou léčbu a u polyartritických forem (Okamoto et al. 2019).

Etanercept je rekombinantní rozpustný fúzní protein lidského receptoru TNFR II s Fc oblastí. Ten se váže na mTNF na povrchu makrofágů a zamezuje tak jeho vazbě s TNFR II na T-buňkách a následnému rozvoji zánětu (Levin et al. 2016). Mechanismus působení adalimumabu byl popsán v kapitole 2.1.5.1.1.

Etanercept je podáván ve formě subkutánních injekcí dvakrát týdně a klinický účinek se dostavuje do 12 týdnů. Adalimumab je podáván stejnou formou a to jednou za 2 týdny. Klinický účinek se obvykle dostaví do 16 týdnů od začátku léčby (Okamoto et al. 2019).

2.3 Mikrobiom

Lidské tělo je hojně osídleno velkým počtem mikroorganismů (bakterie, archea, viry, paraziti), které se souhrnně nazývají jako mikrobiota. Odhaduje se, že počet buněk mikroorganismů převyšuje až desetkrát počet buněk lidského těla. Mikroorganismy kolonizují kůži, ústní dutinu, trávicí trakt, urogenitální trakt či dýchací soustavu. Největší mikrobiální osídlení má gastrointestinální trakt. Složení mikrobioty je analyzováno na základě jejího genomu, protože kultivační metody selhávají v proporční a kvantitativní charakteristice přítomných mikrobů – většina střevních anaerobů je obtížně kultivovatelná nebo nekultivovatelná. V posledních letech se na studium mikrobiomu zaměřilo velké množství vědeckých skupin po celém světě, a to hlavně díky rozvoji a dostupnosti nových technologií, jako je zejména sekvenování nové generace. Byly provedeny velké mezinárodní projekty (evropský MetaHIT – Metagenomics of Human Intestinal Tract, nebo americký Human Microbiome Project), díky nimž došlo k ohromujícímu prohloubení poznatků o složení mikrobiomu ve zdraví a nemoci (Qin et al. 2010; Turnbaugh et al. 2007). Pochopení funkce a složení mikrobiomu se ukazuje být důležitým pro pochopení příčin vzniku některých onemocnění, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění (Pascal et al. 2017), diabetes mellitus (Karlsson et al. 2013), alergie (Zhao, Ho, and Bunyavanich 2019), astma (Abrahamsson et al. 2014) či některá psychiatrická onemocnění (Cheng et al. 2020).

2.3.1 Střevní bakteriom

Střevní mikrobiota se vytváří ihned po narození a dynamicky se vyvíjí do 2-3 let věku. Věkem se zvyšuje její rozmanitost, která se u zdravých dospělých nijak zásadně nemění. Změna nastává opět až se stářím nebo příchodem nemoci.

Novorozenec přichází do kontaktu s prvními mikroorganismy při porodu. Způsob porodu silně ovlivňuje složení mikrobioty. Děti narozené císařským řezem mají menší bakteriální osídlení střeva (hlavně méně bakterií rodu *Bifidobacterium*) a celkový počet buněk vylučujících IgA, IgM a IgG byl vyšší oproti vaginálně narozeným dětem (Huurre et al. 2008). Důvodem je, že děti narozené přirozeně, jsou prvotně osídleny vaginální a střevní mikrobiotou matky bohatou na bifidobakterie, zatímco při císařském řezu jsou to hlavně bakterie z prostředí a kůže matky (Dominguez-Bello et al. 2010). Druh porodu patrně ovlivňuje i imunitní systém, který bývá u vaginálně narozených dětí méně senzitivní vůči fyziologické mikrobiotě (Huurre et al. 2008). Důležitý vliv má také kojení. Zatímco u kojených novorozenců jsou ve střevním bakteriomu hojně zastoupeny bifidobakterie,

u dětí na umělé výživě to jsou rody *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus* (Ma et al. 2020). Koenig et al. (2011) sledovali vývoj střevního mikrobiomu u jednoho dítěte od narození až do věku 2,5 let. Jsou zde jasně zřetelné změny ve složení mikrobioty při přechodu na umělou a později na pevnou stravu (narůstající podíl bakterií kmene *Bacteroidetes* oproti kmenům *Actinobacteria* a *Proteobacteria*), či při užívání antibiotik.

Střevní bakteriom u zdravých dospělých jedinců obsahuje až 1 000 druhů bakterií, přičemž dominují kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Qin et al. 2010). Zatímco v terminálním ileu se odhaduje až 10^8 bakterií/ml (je brán objem uvažovaného orgánu), v tlustém střevě to bývá až 10^{11} bakterií/ml, v drtivé většině anaerobů v důsledku nízkých hodnot kyslíku (Sender et al. 2016). Dlouhodobé sledování stability bakteriomu u 37 zdravých dospělých neužívající antibiotika ukázalo, že až 70 % bakteriomu je stabilní, nejstabilnější byly kmeny *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* oproti méně stabilním kmenům *Firmicutes* a *Proteobacteria* (Faith et al. 2013).

Po stabilním období v dospělosti nastávají významné změny ve složení bakteriomu ve stáří. Změny jsou hlavně důsledkem změny stravy, vyšší nemocnosti a potřeby užívání léků. Snižuje se celkový počet a rozmanitost bakteriomu, zvyšuje se podíl kmene *Bacteroidetes* oproti *Firmicutes*, více je také bakterií kmene *Actinobacteria*. Charakteristické je pro tuto skupinu zvýšení počtu fakultativních anaerobů jako jsou rody *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Proteus* a další. U stoletých dospělých je také znatelný úbytek protizánětlivě působící *Faecalibacterium prausnitzii* a zároveň častější přítomnost *E. coli* (Biagi et al. 2010; Mariat et al. 2009).

Studium mikrobiomu je zásadní také pro pochopení toho, jak bakterie ovlivňují lidské tělo jako celek. Je dokázáno, že mikrobiota má vliv na metabolismus léků, na obnovu střevních epitelálních buněk, na vývoj a aktivitu imunitního systému nebo na psychiku člověka (Turnbaugh et al. 2007). Složení mikrobioty má také vliv na získávání a využití živin a energie z potravy. Obezita je například spjata se schopností bakterií produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (tzv. SCFA, z angl. Short Chain Fatty Acid) mezi něž patří acetát, propionát nebo butyrát. Nejenže totiž některé z nich slouží k výživě enterocytů z lumenární strany, ony mohou být v játrech metabolizovány a následně transformované do lipidů ukládány v adipocytech. Mezi producenty SCFA patří například bakteriální druhy *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus*

či bakterie *Clostridium leptum* nebo *Faecalibacterium prausnitzii* (Tan et al. 2014). Porovnání metabolomu a mikrobiomu a jejich vzájemná souvislost u obézních a neobézních dětí byla cílem i studie naší laboratoře ve spolupráci s laboratoří doc. Havlíka na ČZU, jejíž jsem spoluautorem (Jaimes et al. 2021). V ní byla zjištěna souvislost vyšší koncentrace acetátu a butyrátu ve stolici u obézních dětí s přítomností devíti producentů těchto látek.

2.3.1.1 Střevní bakteriom u Crohnovy choroby

Zásluhou pokroku v metodách pro studium mikrobiomu a znalostech o patogenezi CD se v posledních letech zkoumá jeho složení u této choroby. CD patrně vzniká u geneticky predisponovaných jedinců v souvislosti s dysbiózou mikrobiomu (tj. změnou složení oproti „zdravému“). Jestli je dysmikrobie příčinou nebo důsledkem CD, je předmětem zkoumání. Existují ale studie na zvířecích modelech, které se staví k dysmikrobii jako k příčině CD. Jednou z nich je studie na bezmikrobních myších, které při kolonizaci střeva fekálním vzorkem od CD pacienta vykazovaly pro tuto nemoc charakteristické imunologické změny ve střevě (zvýšení Th17 a snížení Treg buněk) oproti kolonizaci střeva stolicí zdravého jedince (Britton et al. 2019). Souvislost mezi mikrobiotou a CD uvádějí také studie, při kterých došlo ke zlepšení zánětlivého poškození střeva při odklonu fekální biomasy terminální ileostomií při operační resekci střeva (Rutgeerts et al. 1991; Winslet et al. 1994).

Studie mikrobiomu, do níž bylo zapojeno 447 pediatrických pacientů s CD a 221 zdravých kontrol, popsala bakteriální rozdíly ve složení u těchto dvou skupin (Gevers et al. 2014). Pacienti s CD vykazovali nižší diverzitu bakteriomu, zvýšené počty *Enterobacteriaceae* (z pathobiontů například *E. coli* (včetně AIEC – adherentně invazivní), *Proteus mirabilis* a *Klebsiella pneumoniae* (Darfeuille-Michaud et al. 2004)), *Pasteurellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae* a *Gemellaceae* a snížené počty *Bifidobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Clostridiales* a *Bacteroidales* (Gevers et al. 2014). Při používání antibiotik u CD se rozdíly v počtech ještě více prohloubily. Zajímavé je, že větší rozdíly v počtech bakterií vykazovaly slizniční vzorky z terminálního ilea a rekta oproti stolici, v níž některé zmíněné taxony nebyly detekovány jako odlišné od kontrol.

Dysbióza bakteriomu u IBD obecně vykazuje snížení jinak dominantních obligátních anaerobů (bakterie kmenu Firmicutes) a současně nárůst fakultativních

anaerobů jako jsou bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Přítomnost kyslíku v jinak anaerobním prostředí střeva tak může hrát roli ve střevní dysmikrobii. Zvýšení koncentrace kyslíku ve střevě může být důsledkem významnějšího prokrvení někdy i krvácení sliznice, což má za následek uvolňování kyslíku jinak vázaného na hemoglobin v krvi. Na uvolňování reaktivních forem kyslíku se mohou podílet i imunitní buňky (neutrofily) v zánětlivé sliznici střeva (Rigottier-Gois 2013).

Se sníženým počtem bakterií kmene Firmicutes souvisí také snížení počtu producentů SCFA (*F. prausnitzii*, *Roseburia*). Ty jsou získávány hlavně fermentací škrobů a vlákniny a pozitivně ovlivňují buňky imunitního systému (podporují diferenciaci Th0 na Treg buňky), inhibují produkci prozánětlivých cytokinů, regulují aktivitu kinázy NF- κ B (která se podílí na destrukci a zánětu tkání), mají protinádorové a antimikrobiální účinky, vyživují enterocyty a napomáhají k udržení integrity střevní sliznice (Gevers et al. 2014; Maslowski et al. 2009; Tan et al. 2014).

V rámci terapie u IBD byl testován probiotický kmen *Escherichia coli* Nissle 1917. Tento sérotyp *E. coli* prostřednictvím indukce lidských antimikrobiálních peptidů ochraňuje střevní sliznici před adhezí a invazí patogenů posílením slizniční bariéry, má silné imunomodulační účinky (působením na T-buňky snižuje produkci prozánětlivých a zvyšuje produkci protizánětlivých cytokinů) a ovlivňuje obnovu epiteliální buněk střevní sliznice (Schultz 2008). Studie účinnosti toho probiotického kmene byly prováděny hlavně v souvislosti s ulcerózní kolitidou. Kruis et al. (2004) prokázali na skupině 327 pacientů stejnou účinnost *E. coli* Nissle 1917 při udržování remise onemocnění jako užívání mesalazinu. Klinická studie byla provedena i ve spojitosti s CD, kde byl kladný účinek tohoto kmene *E. coli* také pozorován (Malchow 1997). V praxi se používá pro udržení remise u ulcerózní kolitidy.

Vliv léčby anti-TNF α na střevní mikrobiom u CD byl testován v rámci čínské studie u pediatrických pacientů (Wang et al. 2018). Ti u nich před léčbou infliximabem zjistili podobné složení, jako uváděla zde již popisovaná studie (Gevers et al. 2014). Po léčbě infliximabem čínští vědci pozorovali nárůst diversity mikrobioty, snížení počtu bakterií *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Planococcaceae* a *Streptococcaceae* a zvýšení počtu některých producentů SCFA (rody *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Odoribacter* a *Sutterella* stabilně v čase a *Coprococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia* a *Ruminococcus* s krátkodobým účinkem). V rámci této studie ale nebyl tento účinek porovnáván s jinou skupinou pacientů

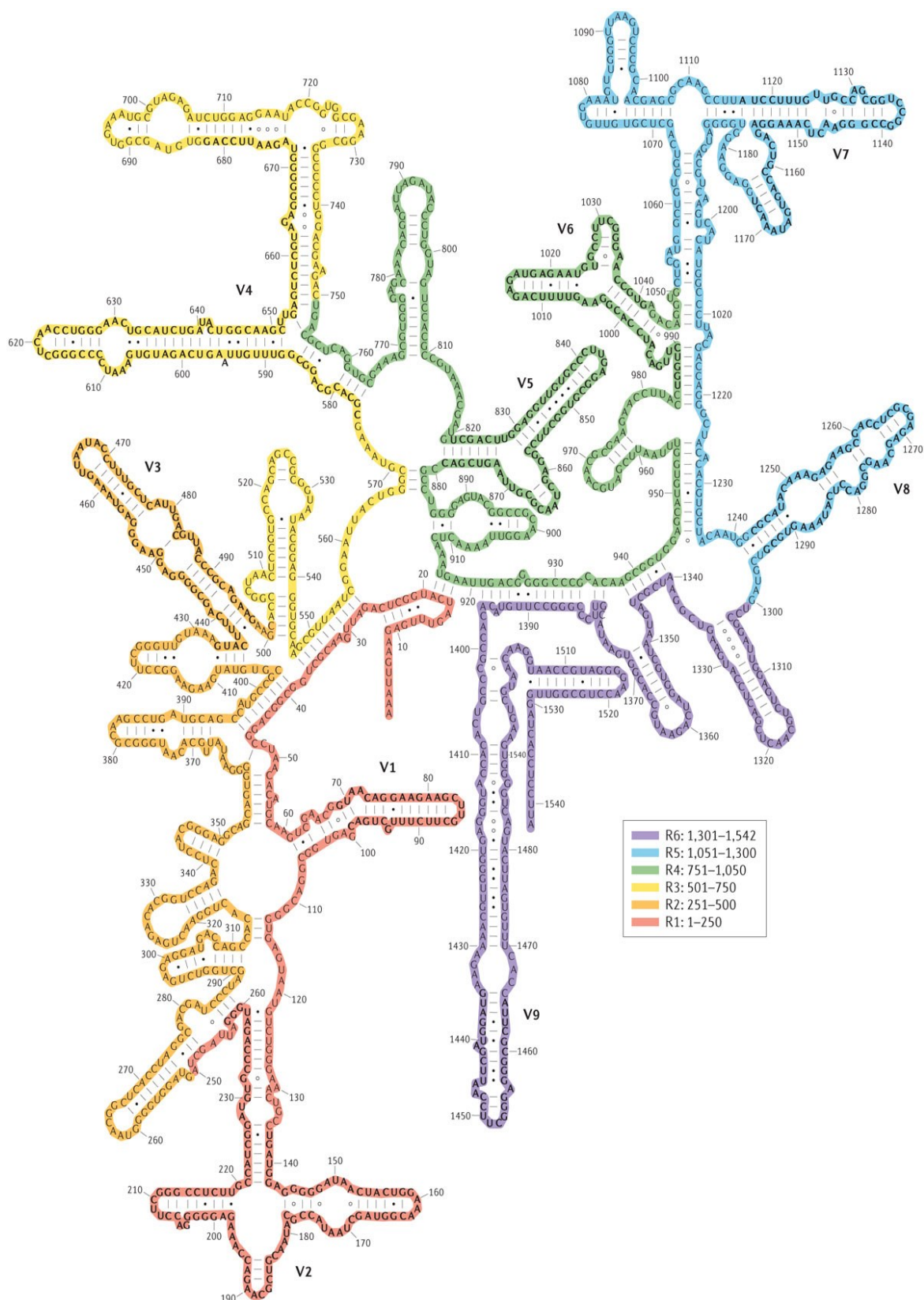
užívající léčbu anti-TNF α nepostihující intestinální trakt. Proto v rámci této diplomové práce bude tato předpokládaná změna složení střevního bakteriomu porovnávána s bakteriomem pacientů s JIA, abychom zjistili, jestli i u nich dojde k posunu složení bakteriomu nebo se jedná o jev specifický pro CD.

2.3.2 16S rRNA

Složení bakteriomu je nejčastěji stanovováno pomocí tzv. amplikonového profilování genu 16S rDNA. Molekula 16S ribozomální RNA je součástí malé podjednotky ribozomu u prokaryot. Tato RNA je kódována genem 16S rDNA, jehož analýza se hojně používá pro taxonomické zařazení bakterií při studiu mikrobiomu. Díky jeho sekvenování mohou být identifikovány i obtížně kultivovatelné nebo zcela nekultivovatelné bakteriální taxony (Wade 2002). Některé bakterie obsahují více než jeden gen 16S rDNA na genom (1-15 kopií), proto by tato vlastnost měla být zohledněna při analýze sekvenčních dat ve studiích, jejichž cílem je zjištění přesné kvantity a složení bakterií ve vzorku (Větrovský and Baldrian 2013). Tento gen je velký asi 1 500 bp a skládá se z vysoce konzervativních (stejná u všech bakterií) a hypervariabilních oblastí V1 až V9 (Obr. 2, str. 28) (Jandhyala et al. 2015).

Z izolované genomové DNA jsou pomocí specifických primerů, které nasedají na konzervativní oblasti genu pro 16S rRNA, amplifikovány metodou PCR variabilní oblasti. Díky sekvenaci těchto variabilních oblastí (nejpoužívanějšími jsou V1-V2, V3, V4, V6 a V8) a jejich porovnání s dostupnými databázemi, jsme schopni bakterie identifikovat na úrovni rodu v 89-98 %, na úrovni druhu v 76-85 % případů (Drancourt et al. 2000; Jandhyala et al. 2015; Mignard and Flandrois 2006). Mezi používané databáze 16S rRNA patří databáze SILVA, GreenGene, EBI Metagenomics a EzTaxon-e (Singh et al. 2017).

V této práci byla k identifikaci bakterií sekvenována variabilní oblast V4 16S rDNA o velikosti ~ 250 bp (Yarza et al. 2014).



Obr. 2: Sekundární struktura 16S rRNA. Barevně jsou odlišeny variabilní oblasti V1 až V9 tak, jak jsou obvykle sekvenovány, tučně jsou v primární sekvenci označeny samotné variabilní oblasti. V této práci byla sekvenována žlutě vyznačená oblast. Převzato od (Yarza et al. 2014).

3 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce je u dětských pacientů s Crohnovou chorobou reagujících na léčbu anti-TNF α najít takové bakteriální taxony, jejichž kvantitativní zastoupení ve střevním bakteriomu se mění v důsledku terapeuticky indukované restituce střeva a nejedná se o obecný projev terapie těmito protilátkami. Pro získání těchto informací je střevní bakteriom pacientů s Crohnovou chorobou podstupující terapii protilátkami anti-TNF α porovnáván se střevním bakteriomem pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou užívající a reagující na stejnou léčbu. Jako kontrolní skupina pro charakterizaci „zdravého“ bakteriomu slouží vzorky stolic od zdravých dětí.

Dílními cíli práce byla příprava sekvenačních knihoven ze vzorků stolic dětských pacientů a od zdravých dětí, ekvalizace knihoven (včetně zhodnocení alternativ tohoto postupu), provedení sekvenace a zhodnocení závěrů dodané statistické analýzy získaných sekvenačních dat.

4 Materiál

4.1 Seznam použitých chemikálií

4.1.1 Chemikálie

název	výrobce
DEPC voda	Ambion, USA
AMPure XP	Beckman Coulter, USA
GelRed Nucleic Acid Stain 10 000	Biotinum, USA
Rotiphorese 10× TBE pufr	Carl Roth, Německo
injekční voda	Fresenius kabi, Německo
PhiX control v3	Illumina, USA
Accuprime Pfx Supermix 90%	Invitrogen, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Life Technologies, USA
Seakem LE Agarose	Lonza, Švýcarsko
hydroxid sodný 10 M	Sigma-Aldrich, USA
xylén-cyanol *	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř *	Sigma-Aldrich, USA
sacharóza *	Sigma-Aldrich, USA
ProClin*	Sigma-Aldrich, USA
ethanol absolutní p.a.	Penta Chemicals

* nanášecí pufr složení: 250 ml destilované vody, 200 g sacharózy, 1,3 g xylén-cyanolu, 1,3 g bromfenolové modře, 150 µl ProClinu

4.1.2 Komerční kity

název kitu	výrobce
DNeasy PowerSoil kit ¹	Qiagen, Německo
HotStarTaq polymerase kit ²	Qiagen, Německo
AmpliTaq Gold DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl ₂ ³	Applied Biosystems, USA
KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms ³	Roche, Švýcarsko
SequalPrep Normalization Plate Kit ⁴	Applied Biosystems, USA
Qubit dsDNA HS Assay Kit ⁵	Invitrogen, USA
High Sensitivity DNA Kit ⁵	Agilent Technologies, USA
MiSeq v2 Reagent Kit (500 cycles) ⁶	Illumina, USA

legenda: 1 – pro izolaci mikrobiální genomické DNA z biologických a environmentálních vzorků; 2 – sada enzymu Taq polymerasy a příslušných reagensů ke kvantifikaci DNA ve vzorku metodou real-time PCR; 3 – sada enzymu, primerů a reagensů pro kvantifikaci sekvenční knihovny metodou qPCR; 4 – sada pufrů a normalizační destičky pro ekvalizaci vzorků sekvenční knihovny; 5 – sady k metodám pro

měření koncentrace DNA v knihovnách; 6 – sada sekvenační kazety, pufru a flow-cell pro sekvenaci na platformě Illumina Miseq

4.1.3 Primery a sondy

4.1.3.1 Kvantifikace úseku V4 16S rDNA po izolaci

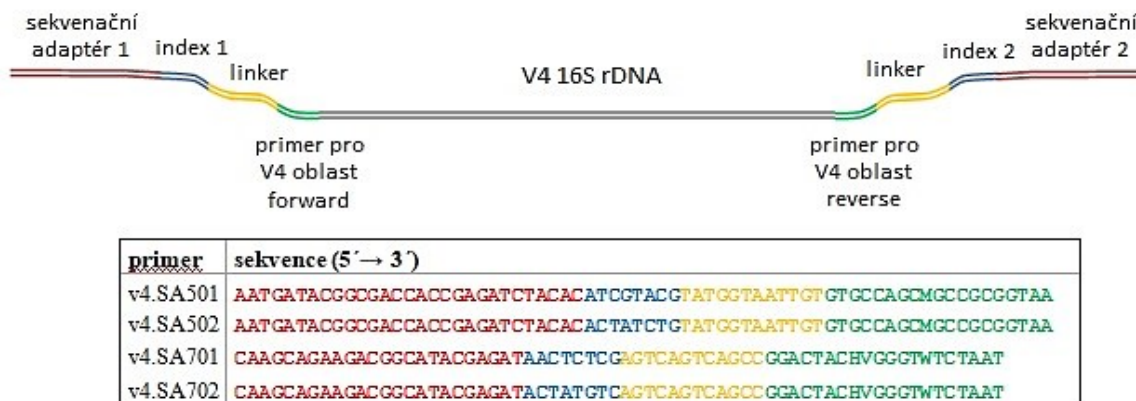
primer	sekvence (5' → 3')
16S_V4F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16S_V4R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

sonda	fluorescenční značka	sekvence (5' → 3')
16S_V4INPROBE	Karboxyfluorescein (6-FAM)	CATTYCACCGCTACAC

Primery jsou specifické ke konzervativním okrajům oblasti V4 16S rDNA. Sonda se váže uvnitř této oblasti do konzervativní sekvence, k vazbě jí pomáhá molekula „minor groove binder“ (patent firmy Thermo Fischer Scientific), která se nespecificky váže do malého žlábků DNA a zvyšuje disociační teplotu. Při real-time PCR je sonda rozštěpena DNA polymerázou při syntéze komplementárního vlákna DNA, čímž se vzdálí fluorescenční donor od akceptoru a dojde ke zvýšení fluorescence.

4.1.3.2 Amplifikace fragmentů V4 16S rDNA a jejich indexování

Sekvence primerů vychází z protokolu laboratoře Petera Schlosse z americké univerzity v Michiganu (Kozich et al. 2013). Primery obsahují adaptérovou sekvenci kompatibilní k adaptérové sekvenci na flow-cell (průtokový sekvenační čip) sekvenačního kitu firmy Illumina, index se specifickou sekvencí pro každý primer (k odlišení vzorků pomocí kombinací dvou primerů), linkeru a forward nebo reverse primeru specifického k V4 oblasti (Obr. 3, str. 32). Sekvence primerů jsou uvedeny v následující tabulce na straně 33.

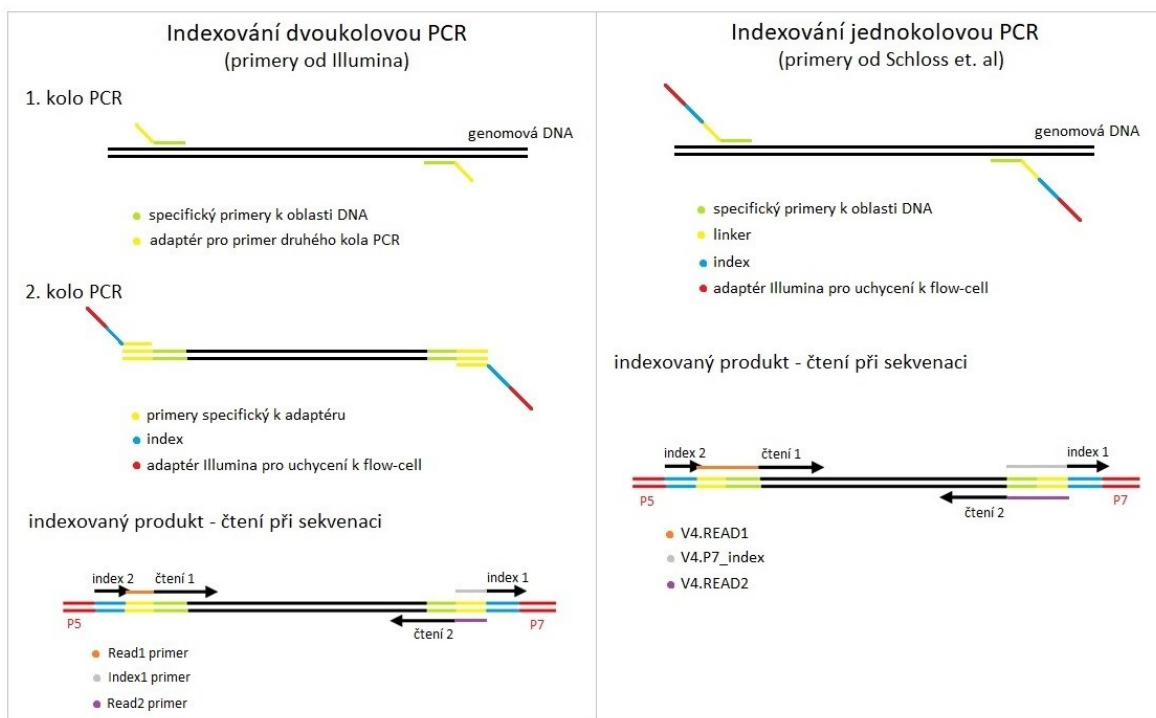


Obr. 3: Schéma a sekvence primerů k amplifikaci a sekvenaci V4 oblasti 16S rDNA.

Primery se skládají ze čtyř oblastí: sekvenačního adaptéru Illumina (červeně), kterým se DNA fragment přichytí k flow-cell, specifického indexu pro identifikaci vzorku (modře), linkeru umožňujícího čtení indexu při sekvenaci (žlutě) a specifické sekvenace pro amplifikaci oblasti V4 genu 16S rDNA (zeleně).

Výhodou těchto primerů je, že indexované fragmenty V4 oblasti jsou připraveny v jedné PCR reakci. Původní protokol od firmy Illumina (Illumina 2013) používá dvoukolovou PCR. V prvním kroku dochází k amplifikaci V4 oblasti (výsledný fragment má na koncích adapter pro druhé kolo PCR a specifickou sekvenaci pro daný úsek), v druhém kole jsou pak připojeny indexové sekvenace a adaptér pro uchycení na flow-cell. Výsledný indexovaný fragment je tak delší než při použití primerů pro jednokolovou PCR. Sekvence tohoto delšího fragmentu pak při čtení poskytuje sekvenace, které se nepřekrývají tolik, jako u čtení fragmentů z jednokolové PCR (sekvenace není tak přesná). Navíc dvě kola PCR vnášejí vyšší zkreslení. Obě metody jsou znázorněny na Obr. 4 na straně 34.

primer	sekvence (5'→3')
v4.SA501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATCGTACGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATCTGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGCGAGTTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGCGTGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCATCGAGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTGAGTGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATATCTTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGACACCGTTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTACTATAATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTACTATATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTCACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTACGAGACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACGTCTCGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGACGAGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGATCGTGTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SB508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTGAGATATATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
v4.SA701	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGAAGTCTGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA702	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTATGTGTCAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA703	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGTAGCGTAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA704	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGTGAGTAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA705	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTACTCAAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA706	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTACGCAGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA707	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAGACTAAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA708	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTCGCTCGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA709	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTCGTAGTAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA710	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAGCAGACAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA711	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTATAGACAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SA712	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGCTATAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB701	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGAAGTCTGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB702	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATACTTTCAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB703	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCTGCTAAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB704	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATAGAGAAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB705	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTAGATCAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB706	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCGTTACAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB707	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGCACGTAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB708	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGTACTATAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB709	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTATACGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB710	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACGAGCAAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB711	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACGCTTAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.SB712	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGCTACGAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT



Obr. 4: Schéma přípravy sekvenačních knihoven pomocí dvoukolové a jednokolové PCR. Dvoukolová PCR: V prvním kole je amplifikován cílový fragment DNA a jsou k němu připojeny adaptéry pro druhé kolo PCR. V druhém kole nasedají specifické primery na adaptéry z prvního kola PCR a vzniká produkt obsahující adaptér Illumina pro připojení k flow-cell, index, adaptér s primerovou sekvencí a fragment DNA. Při sekvenaci nasedá primer Read1 na adaptér (čtení 1), Index1 na adaptér Illumina (čtení 1) indexu P7 – index 1), následuje čtení indexu P5 – index 2 (primer je připojený k flow-cell, proto se nemusí do sekvenace přidávat navíc) a čtení 2, při němž nasedá primer Read2 také na adaptérovou sekvenci na druhé straně. Jednokolová PCR: Při amplifikaci cílového fragmentu DNA je připojen pomocí specifického primeru linker, index a adaptér Illumina. Sekvence pak probíhá jako u dvoukolové PCR, jen primery V4.READ1 a V4.READ2 nasedají na linker i sekvenci původního primeru. Proto u produktu jednokolové PCR je čten pouze DNA fragmentu (250 bp), zatímco u produktu dvoukolové PCR je navíc čtena ještě sekvence cca 20-25 bp v oblasti původního amplifikačního primeru (cca 230 bp). Připraveno na základě informací z prospektů firmy Illumina a článku Kozich et al. 2013.

primer	sekvence (5' → 3')
V4.READ1	TATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
V4.READ2	AGTCAGTCAGCCGACTACHVGGGTWTCTAAT
v4.P7_index	ATTAGAWACCCBDGTAGTCCGGCTGACTGACT

Sekvenační kazeta již v sobě má připravené primery pro sekvenování PhiX kontrolní knihovny s adaptéry. Protože ale knihovna obsahující označené fragmenty DNA ze vzorků je připravena Schlossovými primery a ne původními od Illumina, je nutné ještě tyto Schlossovy primery pro sekvenaci přidat.

4.1.4 Mock komunity

Mock komunita je směs bakteriální genomické DNA o známém složení, která slouží jako pozitivní kontrola při sekvenaci.

	složení
Microbial Mock Community B (c.n. HM-782D) - výrobce: Bei Resources, USA	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>

4.2 Přístroje

název	výrobce
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, USA
elektroforetická vana Midigel XL	Apelex, Francie
PCR desky MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, USA
fólie MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, USA
ABI 7300 Realtime PCR System	Applied Biosystems, USA
robot Biomek 4000	Beckman Coulter, USA
zdroj Power Pac 200	Bio-Rad, USA
pipeta Research Pro	Eppendorf, Německo
centrifuga MiniSpin Plus	Eppendorf, Německo
centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
NGS sekvenátoru MiSeq	Illumina, USA
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen, USA
robot QIAcube	Qiagen, Německo
zásobníky Rotor Adaptor	Qiagen, Německo
Lightcycler 480	Roche, Švýcarsko

Lightcycler 480 Multiwell Plate 384
Biosphere Filter Tips
mikrozkumavky 1,5 ml a 2,0 ml
Vortex Genie 2T
horizontální Vortex Genie 2
LabCycler
laminární box
pipeta E1-Clip-Tip
pipeta Finnpipette, F2
Sterile Clip-Tip
transluminátor TFX-26.MC

Roche, Švýcarsko
Sarstedt, USA
Sarstedt, USA
Scientific Industries, USA
Scientific Industries, USA
Sensquest, Německo
Schoeller Instruments, ČR
Thermo Fischer Scientific, USA
Thermo Fischer Scientific, USA
Thermo Fischer Scientific, USA
Vilber Lournat, Francie

4.3 Vzorky stolic od dětských pacientů

Pro studium vlivu léčby anti-TNF α byly odebírány vzorky od dvou skupin pacientů (CD a JIA) a kontrolní skupiny. Do studie byli začleněni pacienti z FN Motol, FN Thomayerovy nemocnice, FN Plzeň, FN Olomouc a Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně. Kritéria pro vstup do studie byla následující:

1. Pacienti s nově diagnostikovanou nebo již léčenou Crohnovou chorobou ve věku 3-17 let. Pro analýzu bakteriomu v této práci byly využity vzorky i těch pacientů, u kterých ještě nebyla v průběhu sledování zahájena léčba preparáty anti-TNF α .
2. Pacienti s nově diagnostikovanou nebo již léčenou juvenilní idiopatickou artritidou ve věku 3-17 let, u nichž bylo na základě hladiny fekálního kalprotektinu vyloučena přítomnost střevního onemocnění. Pacienti byli dále pozitivně testováni na přítomnost alely HLA B27. Pro analýzu bakteriomu v této práci byly použity i vzorky těch pacientů, u kterých nebyla v průběhu sledování indikována léčba anti-TNF α .
3. Kontrolní skupina složená ze zdravých dětí ve věku 3-17 let, plánovaně hospitalizovaných na Klinice dětské chirurgie FN v Motole pro vybrané výkony bez nutnosti užívání antibiotik (cirkumcize, kýla, retence varlete) u nichž nebyla stanovena diagnóza CD ani JIA.

Vzorky od pacientů s CD i JIA byly odebírány pravidelně jedenkrát měsíčně a to od vstupu do studie, přes období zahájení biologické léčby až do ukončení sledování tří

Kromě stanovení bakteriomu, které je součástí této diplomové práce, budou vzorky dále použity pro stanovení viromu, jednobuněčného parazitomu a metabolomu. Tyto analýzy již nejsou součástí této práce.



5 Metody

5.1 Izolace DNA

Celková DNA ze stolic dětí byla izolována pomocí komerčního kitu DNeasy PowerSoil kit podle návodu výrobce. Sada obsahuje zkumavky PowerBead Tube s roztokem a kamínky pro homogenizaci vzorku, lyzační roztok C1 a roztoky C2-C6. Jako negativní kontrola byl použit samotný roztok v PowerBead Tube. Negativní kontrola byla po izolaci používána v dalším postupu paralelně s extrahovanými DNA.

K izolaci bylo použito přibližně 100 mg stolice, která byla přidána k roztoku s kamínky. Nejprve byla provedena manuální homogenizace vzorku a lýza buněk horizontálním vortexováním po dobu 15 min. Homogenát byl centrifugován na 10 000× g po dobu 45 s a vzniklý supernatant byl odpipetován do příslušné pozice v zásobníku vkládaném do robota („Rotor adaptér“). Zásobníky se vzorky, kolonkami se silikátovým filtrem pro izolaci DNA a prázdnými zkumavkami na eluát byly vloženy do robota Qiacube, stejně jako lahvičky s příslušnými pufry, špičky o objemu 1 ml a zkumavky o objemu 2 ml. Další kroky, tedy odstranění inhibitorů, navázání DNA, její promytí a eluce, byly provedeny robotem. Konečným produktem izolace bylo 100 µl eluované DNA.

5.2 Real-time PCR

Real-time polymerázová řetězová reakce slouží ke kvantifikaci DNA (v mém případě ke kvantifikaci úseku V4 16S rDNA). Metoda využívá principu PCR za použití speciálního cykleru, který v reálném čase odečítá hodnoty fluorescence dané reakce v každé jamce, které jsou úměrné kvantitě amplifikovaného cílového fragmentu.

K přípravě reakční směsi byla použita polymeráza HotStarTaq polymerase a její pufr:

	μl na vzorek	zásobní koncentrace	koncentrace v reakci
injekční voda	8,70 μl		
PCR pufr + MgCl ₂	1,50 μl	10× + 15 mM	1× + 1,5 mM
MgCl ₂	0,90 μl	25 mM	1,5 mM
dNTP	0,60 μl	5 mM	0,2 mM
ROX-6	0,15 μl	100 μM	1 μM
primer 16S V4F	0,375 μl	20 μM	0,5 μM
primer 16S V4R	0,375 μl	20 μM	0,5 μM
sonda 16S V4INPROBE	0,30 μl	10 μM	0,3 μM
polymeráza HotStar	0,10 μl	5 U/μl	0,5 U/ 15 μl
DNA	2,00 μl		
celkový objem	15,00 μl		

Každý vzorek byl pro reakci připraven v duplikátu. Připravená PCR destička s reagensiiemi a vzorky byla ampifikována v termocykleru ABI 7300 Real Time PCR System následujícím pogramem:

denaturace	95 °C	15 min	
40 cyklů	94 °C	15 s	
	60 °C	60 s	← sběr fluorescenčních dat
	72 °C	30 s	

Výsledné křivky reakce jsou zaznamenávány a analyzovány v programu 7300 System SDS Software. Inhibované vzorky, jejichž křivka detekce fluorescence je zploštělá v důsledku pomalejší amplifikace, jsou pro další reakce ředěny v poměru 1:4 (vzorek:injekční voda).

5.3 Příprava sekvenační knihovny

Metodický postup a sekvence primerů jsou založeny na protokolu laboratoře Patricka Schlosse z americké univerzity v Michiganu (Kozich et al. 2013).

5.3.1 PCR – připojení indexů

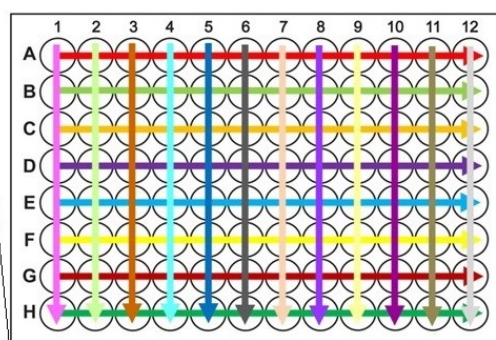
Stěžejním bodem přípravy sekvenační knihovny je amplifikace úseku V4 16S rDNA ve vzorku. Použitím primerů s indexy a adaptéry je v jedné reakci připraven fragment přímo k sekvenaci. Jejich sekvence jsou uvedeny v kapitole 4.1.3. Každý indexovaný primer se skládá ze sekvenačního adapteru, indexu, linkeru a primeru pro přední nebo zpětné čtení sekvence (forward nebo reverse) specifického k V4 oblasti (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** na str. 32). Tyto primery byly vybírány tak, aby každý vzorek měl unikátní kombinaci indexů, která ho bude identifikovat při sekvenaci (Obr. 6). Pro přípravu jednoho sekvenačního běhu je používán se 16 reverse a 24 forward primerů, celkem k amplifikaci 384 vzorků (resp. 192 vzorků v duplikátech).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	A701	A702	A703	A704	A705	A706	A707	A708	A709	A710	A711	A712	B701	B702	B703	B704	B705	B706	B707	B708	B709	B710	B711	B712	
A A501	NK1	g918	g925	g958	g965	g972	g979	g987	g995	g1003	g1011	g1098	g1108	g1113	g1120	g1133	g1140	g1147	g1154	g1162	g1170	g1178	g1191	g1199	A
B A502	g911	NK2	g926	g959	g966	g973	g980	g988	g996	g1004	g1091	g1099	g1107	g1114	g1122	g1134	g1141	g1148	g1155	g1163	g1171	g1179	g1192	g1200	B
C A503	g912	g919	NK3	g960	g967	g974	g981	g989	g997	g1005	g1092	g1100	g1108	g1115	g1126	g1135	g1142	mock_	g1156	g1164	g1172	g1180	g1193	g1201	C
D A504	g913	g920	g953	NK4	g968	g975	g982	g990	g998	g1006	g1093	g1101	g1109	g1116	g1127	g1136	NK5	g1149	g1157	g1165	g1173	g1182	g1194	g1202	D
E A505	g914	g921	g954	g961	NK5	g976	g983	g991	g999	g1007	g1094	g1102	g1110	g1117	g1128	NK4	g1143	g1150	g1158	g1166	g1174	g1187	g1195	g1203	E
F A506	g915	g922	g955	g962	g969	mock_	g984	g992	g1000	g1008	g1095	g1103	g1111	g1118	NK3	g1137	g1144	g1151	g1159	g1167	g1175	g1188	g1196	g1204	F
G A507	g916	g923	g956	g963	g970	g977	g985	g993	g1001	g1009	g1096	g1104	g1112	NK2	g1131	g1138	g1145	g1152	g1160	g1168	g1176	g1189	g1197	g1205	G
H A508	g917	g924	g957	g964	g971	g978	g986	g994	g1002	g1010	g1097	g1105	NK1	g1119	g1132	g1139	g1146	g1153	g1161	g1169	g1177	g1190	g1198	g1206	H
I B501	g1206	g1198	g1190	g1177	g1169	g1161	g1153	g1148	g1139	g1132	g1119	NK1	g1105	g1097	g1010	g1002	g994	g986	g978	g971	g964	g957	g924	g917	I
J B502	g1205	g1197	g1189	g1176	g1168	g1160	g1152	g1145	g1138	g1131	NK2	g1112	g1104	g1096	g1009	g1001	g993	g985	g977	g970	g963	g956	g923	g916	J
K B503	g1204	g1196	g1188	g1175	g1167	g1159	g1151	g1144	g1137	NK3	g1118	g1111	g1103	g1095	g1008	g1000	g992	g984	mock_	g999	g962	g955	g922	g915	K
L B504	g1203	g1195	g1187	g1174	g1166	g1158	g1150	g1143	NK4	g1128	g1117	g1110	g1102	g1094	g1007	g999	g991	g983	g976	NK5	g961	g954	g921	g914	L
M B505	g1202	g1194	g1182	g1173	g1165	g1157	g1149	NK5	g1136	g1127	g1116	g1109	g1101	g1093	g1006	g998	g990	g982	g975	g968	NK4	g953	g920	g913	M
N B506	g1201	g1193	g1180	g1172	g1164	g1156	mock_	g1142	g1135	g1126	g1115	g1108	g1100	g1092	g1005	g997	g989	g981	g974	g967	g960	NK3	g919	g912	N
O B507	g1200	g1192	g1179	g1171	g1163	g1155	g1148	g1141	g1134	g1125	g1114	g1107	g1099	g1091	g1004	g996	g988	g980	g973	g966	g959	g926	NK2	g911	O
P B508	g1199	g1191	g1178	g1170	g1162	g1154	g1147	g1140	g1133	g1124	g1113	g1106	g1098	g1011	g1003	g995	g987	g979	g972	g965	g958	g925	g918	NK1	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	

Plates:

A1C
B1D

A1 
B1 
C1 
D1 



Obr. 6: Schéma kombinací indexů při amplifikaci indexovaných fragmentů DNA.

Horní tabulka uvádí rozložení vzorků ve čtyřech PCR deskách A až D, přičemž desky A a D jsou duplikátem a B a C jsou duplikátem. Dolní schéma PCR destičky znázorňuje, jak jsou pipetovány jednotlivé specifické indexy (v každém řádku/sloupci jeden index). Výsledkem jsou indexované fragmenty, z nichž každý má unikátní kombinaci indexů (naznačeno barevně).

Jako pozitivní kontrola o daném bakteriálním složení byly použity dvě mock komunity – jedna vytvořená v naší laboratoři a druhá komerční od firmy Bei Resources (USA). Jejich složení je pospáno v tabulce v kapitole 4.1.4.

PCR reakce nebyla připravena podle následující tabulky:

	μl na vzorek	zásobní koncentrace	finální koncentrace v reakci
Accupr. Pfx Supermix 90%	18,0 μl	22 U/ml (polymeráza)	0,4 U/21,6 μl
primer s P7 indexem	1,2 μl	10 μM	0,56 μM
primer s P5 indexem	1,2 μl	10 μM	0,56 μM
DNA	1,2 μl		
celkový objem	21,6 μl		

PCR destička s reakční směsí byla vložena do termocykleru, na kterém byl spuštěn následující program, a po jeho konci byla destička krátce centrifugována a uložena v lednici při 4 °C.

denaturace	95 °C	5 min
30 cyklů	95 °C	15 s
	55 °C	30 s
	68 °C	60 s
závěr	68 °C	5 min
	4 °C	∞

Produkty PCR byly vizualizovány na gelové elektroforéze. Byl připraven 2% agarózový gel rozpuštěním 10 g agarózy v 500 ml TBE pufru a jejím krátkým povařením. K 180 ml 2% agarózy byly přidány 4 μl GelRed Nucleic Acid Stain. Do každé jamky gelu byla nanesena směs 3 μl vzorku a 7 μl nanášecího pufru (jeho složení v kapitole 4.1.1). Jako referenční marker byl použit GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Elektroforéza byla provedena při 135 V po dobu 30 min a hotový gel byl vyfotografován při nasvícení UV světlem na transluminátoru.

5.3.2 Ekvalizace PCR produktů v knihovně

Aby byla zajištěna podobná hloubka čtení při sekvenaci pro každý vzorek, je nutné jejich koncentraci v knihovně ekvalizovat. V naší laboratoři se dlouho využívá metody kvantifikační PCR za použití KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms, díky níž zjistíme přesnou koncentraci každého vzorku a získáme matici pro jejich ředění.

Nově u nás byla zavedena metoda ekvalizace pomocí komerčního kitu SequalPrep. Pro testování jeho účinnosti byly připraveny indexované fragmenty V4 16S rDNA úseku, připravované za různých koncentrací genomové DNA a primerů (poloviční, používané a dvojnásobný objem dané složky). Tím jsem připravila několik variant vzorků a zkoumala jsem, jak důkladně je tato metoda schopna tyto vzorky přechistit a ekvalizovat. Na základě poznatků při práci s kitem a návodu od výrobce jsem navrhla postup pipetování, který byl následně do robota Biomek 4000 naprogramován servisním technikem firmy Beckman Coulter. Spojení kitu SequalPrep s robotizací výrazně zkrátilo dobu přípravy knihoven a také šetří velké množství chemie a plastů oproti použití kvantifikační PCR. Porovnání účinnosti obou metod při ekvalizaci vzorků na stejnou koncentraci je uvedeno v kapitole 6.1.

Protože obě metody byly použity pro přípravu sekvenačních knihoven k této práci, budou zde obě popsány.

5.3.2.1 Purifikace AMPure XP a KAPA qPCR

Od PCR produktů po indexování bylo nutné nejprve odmyt zbylé složky reakce, jako jsou nukleotidy, primery a další. Pro tento účel byl použit komerční roztok pro purifikaci **AMPure XP** - roztok paramagnetických kuliček, které na sebe naváží DNA produkty, nasazením na magnetický stojánek se kuličky s DNA přichytí ke stěně jamky a všechny ostatní složky reakce se odstraní promytím 75% etanolem. Purifikace metodou AMPure XP byla provedena automatizovaně na robotu Biomek 4000.

Před purifikací byly produkty PCR reakce naředěny injekční vodou do konečného objemu 30 μ l. Ředěný PCR produkt a roztok AMPure XP byly smíchány v poměru 1:0,7. Směs byla promíchána pipetováním a inkubována po dobu 5 min v pokojové teplotě. Následně byla destička se směsí přenesena na magnetický stojánek a po dobu 5 min se nechaly paramagnetické kuličky separovat na stěnách jamky v okolí magnetu. Vzniklý čirý roztok byl odstraněn a kuličky s DNA byly promyty 100 μ l 75% etanolu. Po třiceti

sekundách inkubace byl etanol odstraněn. Promývací krok byl dvakrát opakován. Zbytky etanolu v jamkách vysychaly na vzduchu po dobu 15 min. Přечиštěný PCR produkt byl eluován do 50 µl injekční vody s následnou 5 minutovou inkubací pro uvolnění DNA z kuliček. Protože magnetické kuličky v roztoku DNA zůstávají, další práce s destičkou musí být prováděny na magnetickém stojánku.

KAPA Library Quantification kit je komerční sada používaná pro kvantifikaci DNA metodou real-time PCR (qPCR). Sada obsahuje šest DNA standardů (20-0,0002 pM), mix primerů a KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×). Metoda umí kvantifikovat DNA až do minimální koncentrace 0,0002 pM.

Přечиštěný PCR produkt je nutné před kvantifikací KAPA qPCR 10 000× naředit injekční vodou. Při použití nového KAPA qPCR kitu je nutné smíchat KAPA SYBR FAST qPCR MM s primery v poměru 5:1. Reakce byla připravena podle následujícího předpisu:

	µl na vzorek	zásobní koncentrace	koncentrace v reakci
injekční voda	4,0 µl		
Amplitaq Gold buffer	0,5 µl	10×	0,5×
MgCl ₂ Amplitaq Gold	0,5 µl	25 mM	1,25 mM
KAPA SYBR FAST qPCR MM s primery	3,0 µl	2× + 10×	0,6× + 3×
DNA (10 000× ředěná)	2,0 µl		
celkový objem	10 µl		

Reakce pro každý vzorek byla připravena v duplikátu. Aby byla kvantifikace možná, byly připraveny i reakce se standardy, na jejichž základě je sestavena kalibrační křivka, a vypočítány koncentrace DNA ve vzorcích.

Na základě výsledků z KAPA qPCR byla stanovena diluční strategie přípravy sekvenační knihovny. Z původních PCR produktů byl každý vzorek ředěn tak, aby výsledná koncentrace všech vzorků byla stejná, tedy 2 000 pM. Následně byl vytvořen pool smícháním stejného molárního množství každého vzorku. Ředění a pooling byly prováděny pomocí robota Biomek 4000.

5.3.2.2 SequalPrep

SequalPrep Normalization Plate Kit je sada pro ekvalizaci vzorků DNA v sekvenační knihovně. Sada obsahuje normalizační destičku a 3 pufrů (vazebný, promývací a eluční). Normalizační 96-jamková destička má jamky potažené speciálním

filmem, který mění svůj náboj v závislosti na pH roztoku v jamce. Kyselý vazebný pufr nabije film kladným nábojem a na povrch jamky se naváže amplifikovaná DNA z PCR. Poté se DNA čistí promývacím pufrem, který odstraní všechny ostatní komponenty PCR. Zásaditý eluční pufr nabije film jamky záporně a dojde k uvolnění DNA do pufru. Jamka váže omezené množství DNA (maximální výtěžek je cca 25 ng DNA při eluci 20 μ l). Byly použity nepřečištěné PCR produkty po amplifikaci, které byly naředěny injekční vodou na výsledný objem 30 μ l.

Ekvalizace byla provedena robotem Biomek 4000. K normalizaci byla použita část ředěného PCR produktu (10 μ l), která byla smíchána v normalizační destičce s 10 μ l vazebného pufru. Vše bylo promícháno pipetováním a krátce centrifugováno pro odstranění bublinek v jamkách. Směs se nechala 1 hodinu inkubovat. Následně byla směs opatrně odpipetována tak, aby nedošlo ke kontaktu pipetové špičky se stěnou jamky, na níž byla navázána DNA. Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l promývacího pufru, který byl několikrát nasán a vypuzen pipetou a poté důkladně odstraněn tak, že nedošlo ke kontaktu pipetové špičky se stěnou jamky. Eluce DNA proběhla přidáním 20 μ l elučního pufru a následnou inkubací po dobu 5 min. Z každé jamky bylo odebráno 5 μ l pro vytvoření poolu sekvenační knihovny.

Pro vizuální ověření ekvalizace PCR produktů, byly všechny vzorky naneseny na agarózový gel. Gel byl připraven ze 180 ml agarózy v TBE pufru a 7 μ l GelRed Nucleic Acid Stain. Do každé jamky gelu byla nanesena směs 7 μ l vzorku a 5 μ l nanášecího pufru. Elektroforéza byla provedena při 135 V po dobu 30 min a hotový gel byl vyfotografován při nasvícení UV světlem na transluminátoru.

5.4 Sekvenování nové generace – Illumina MiSeq

V rámci přípravy jednoho sekvenačního běhu jsou vždy připravovány celkem 4 PCR desky v 96 jamkovém formátu (Obr. 6, str. 40) a z každé z nich je připraven jeden pool. Jejich koncentrace a velikost DNA fragmentu (očekávaná délka 390-400 bp) byla změřena pomocí fluorimetru Qubit (za použití Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kitu) a přístroje na automatizovanou elektroforézu Bioanalyzer 2100 (High Sensitivity DNA kit). Obě metody byly použity podle manuálů výrobců. Na základě koncentrace poolů a počtů vzorků v nich byl připraven finální pool, který byl použit pro sekvenaci.

Posledním krokem před samotným sekvenováním byla denaturace finální knihovny. Denaturace byla provedena těsně před sekvenováním, aby byla zajištěna co nejlepší schopnost tvorby klastrů při sekvenování. K denaturaci byl použit čerstvě naředěný roztok NaOH o výsledné koncentraci 0,2 M, čerstvě naředěný roztok HCl o konečné koncentraci 0,2 M, HT1 pufr z komerčního kitu MiSeq v2 Reagent Kit (500 cycles) a komerční PhiX knihovnu (PhiX Control v3 – knihovna genomu bakteriofága PhiX opatřená adaptéry, která slouží jako kontrola pro sekvenaci na platformě Illumina a zároveň zlepšuje tvorbu klastrů na flow-cell). Podle koncentrace finálního poolu byl finální pool denaturován jednou z těchto možností:

- postup denaturace finálního poolu o koncentraci 2 000 pM

1) denaturace DNA knihovny vzorků

K 5 μ l 2 nM DNA knihovny (finální pool) bylo přidáno 5 μ l 0,2 M NaOH. Směs byla vortexována, krátce centrifugována a inkubována při pokojové teplotě 5 min. Po inkubaci bylo ke směsi připipetováno 990 μ l HT1 pufru chlazeného na ledu. Následně bylo 400 μ l této směsi ředěno 600 μ l HT1 pufru k dosažení konečné koncentrace 4 pM.

2) denaturace PhiX knihovny

Byla připravena směs 2 μ l 10 nM PhiX knihovny, 3 μ l DEPC vody a 5 μ l 0,2 M NaOH. Roztok byl promíchán pipetováním, inkubován 5 min a následně smíchán s 1 590 μ l chlazeného HT1 pufru na konečnou koncentraci 12,5 pM.

3) smíchání obou knihoven

Na ledu byla připravena finální denaturovaná knihovna smícháním 540 μ l 4 pM knihovny DNA ze vzorků a 60 μ l 12,5 pM PhiX knihovny. Tento mix byl použit do sekvenační kazety.

- postup denaturace finálního poolu při koncentraci nižší než 2 000 pM (použito u finálního poolu s koncentrací 1 387 pM)

1) denaturace DNA knihovny vzorků

Ke 20 μ l 1 387 pM DNA knihovny (finální pool) bylo přidáno 5 μ l 0,2 M NaOH. Směs byla vortexována, krátce centrifugována a inkubována při pokojové teplotě 5 min v pokojové teplotě a následně 2 min při 90 °C. Po inkubaci byla směs ponechána 5 min na ledu a poté k ní bylo přidáno 600 μ l

HT1 pufru chlazeného na ledu a 6,5 μ l 0,2 M HCl. Tímto byl získán pool o koncentraci 43,8 pM. Následně bylo 50 μ l této směsi ředěno 500 μ l HT1 pufru k dosažení konečné koncentrace 4 pM.

2) denaturace PhiX knihovny

Byl připraven mix 2 μ l 10 nM PhiX knihovny, 3 μ l DEPC vody a 5 μ l 0,2 M NaOH. Roztok byl promíchán pipetováním, inkubován 5 min a následně smíchán s 1 590 μ l chlazeného HT1 pufru na konečnou koncentraci 12,5 pM.

3) smíchání obou knihoven

Na ledu byla připravena finální denaturovaná knihovna smícháním 540 μ l 4 pM knihovny DNA ze vzorků a 60 μ l 12,5 pM PhiX knihovny. Tento mix byl použit do sekvenační kazety.

S denaturovanou knihovnou, rozmraženou sekvenační kazetou a druhým boxem kitu MiSeq v2 Reagent Kit (obsahující flow-cell a láhev s pufrem) jsem dále pracovala u sekvenačního přístroje Illumina MiSeq (Obr. 7, str. 47). Flow-cell byla omyta destilovanou vodou, důkladně osušena a vložena do sekvenátoru. Kazeta obsahuje sekvenační primery pro produkty připravené generickými primery Illumina (v tomto případě pro sekvenaci PhiX knihovny). Protože k amplifikaci DNA fragmentů ze vzorků byly použity jiné primery (z laboratoře Patricka Schlosse) je nutné do kazety přidat k nim příslušné primery sekvenační. Proto byly do příslušných pozic v kazetě podle návodu výrobce napipetovány sekvenační primery o koncentraci 100 μ M a objemu 3 μ l (V4.READ1, v4.P7_index a V4.READ2) a denaturovaná knihovna. Připravená kazeta a láhev s pufrem byly vloženy do sekvenátoru.



Obr. 7: MiSeq sekvenační kit (průtokový sekvenační čip, kazeta a pufr) a sekvenátor Illumina MiSeq. Oranžové šipky ukazují, na jaká místa v sekvenátoru se vkládají příslušné části ze sekvenačního kitu. Modrá šipka ukazuje místo v sekvenační kazetě, kam se pipetuje denaturovaná sekvenační knihovna. Převzato a upraveno podle <https://line.17qq.com>.

Do počítače v sekvenátoru byl nahrán csv soubor, který obsahoval čárkami oddělený seznam sekvenovaných vzorků a příslušné indexy, které byly pro daný vzorek specifické. Tato část je důležitá pro identifikace a přiřazení jednotlivých čtení sekvencí k příslušnému vzorku. Data ze sekvenátoru byla průběžně nahrávána na cloud webového serveru Basespace Illumina. Výsledná data ve formátu fastq byla po skončení sekvenačního běhu ze serveru stažena a dále bioinformaticky analyzována.

5.5 Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza byla provedena jinými členy týmu a v diplomové práci její výsledky interpretují a diskutují. Její stručné shrnutí je následující:

- Čtení z provedené sekvenace byla stažena z cloudového úložiště BaseSpace ve formě demultiplexovaných fastq souborů, již s odstraněnými sekvenačními adaptéry.
- K primární analýze byla použita pipeline DADA2 (verze 1.16) dle pokynů autorů (Callahan et al. 2016). Sekvence byly taxonomicky zařazeny pomocí databáze SILVA verze 132 (Quast et al. 2013). Amplikonové sekvenační varianty

(Amplicon sequence variants, ASV, analogické operačním taxonomickým jednotkám OTU) byly poté analyzovány pomocí balíčku *vegan* (Oksanen et al. 2019) a *phyloseq* (McMurdie and Holmes 2013) v prostředí programovacího jazyka (R Core Team 2018).

- Vzorky byly sekvenovány v duplikátech, čili prvním krokem byla kontrola počtu čtení a shody replikátů pomocí ordinačního grafu non-metrického multidimensionální škálování (NMDS) Bray-Curtisovy vzdálenosti mikrobiomů. Po této vizuální kontrole byly duplikáty sloučeny.
- Negativní kontroly byly zkontrolovány na předpokládanou absenci většího počtu čtení a na obsah odpovídající přeslechům z ostatních kombinací indexů plus vlastní amplifikaci kontaminant z reagensů. Pozitivní kontroly (mock komunity) byly zkontrolovány na shodu s předpokládaným složením bakteriomu.
- Množiny čtení byly pak rarefikovány na 10,000 čtení na vzorek (blízko nejnižšímu zjištěnému počtu čtení).
- Alfa diverzita (uvnitř vzorku) byla hodnocena pomocí následujících indexů: počet pozorovaných druhů, Chao1, Shannon, Simpson. Jejich hodnoty byly mezi skupinami vzorků srovnávány především neparametrickými metodami.
- Rozdíly ve složení komunit byly hodnoceny pomocí vizuální inspekce grafů složení a pomocí formálního testování permutačními testy na jednotlivé prediktory v *redundancy analysis*, a *distance-based redundancy analysis*. Změny konkrétních taxonů byly hodnoceny pomocí multivariantního modelování nástrojem DeSeq2.

6 Výsledky

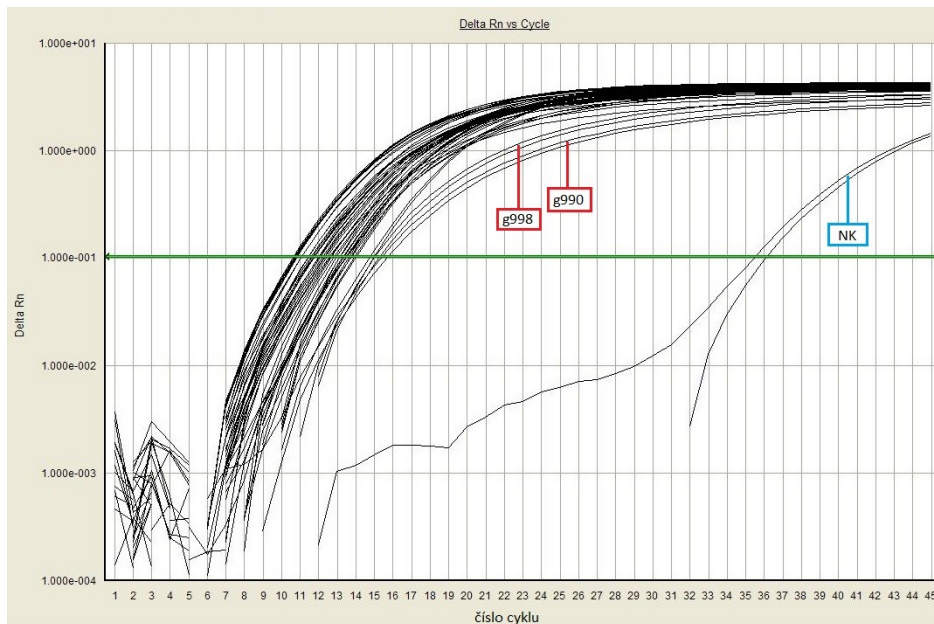
6.1 Kontrolní body při přípravě sekvenačních knihoven

Celkem bylo analyzováno 266 vzorků v duplikátech ve třech sekvenačních bězích. Jejich přehled je uveden v Tab. 2.

Tab. 2: Přehled celkového počtu pacientů a vzorků ve studii. V tabulce je uveden celkový počet vzorků, počty pacientů jednotlivých skupin a počty vzorků z každé skupiny. Dále jsou tyto počty rozlišeny na vzorky před a po terapii anti-TNF α .

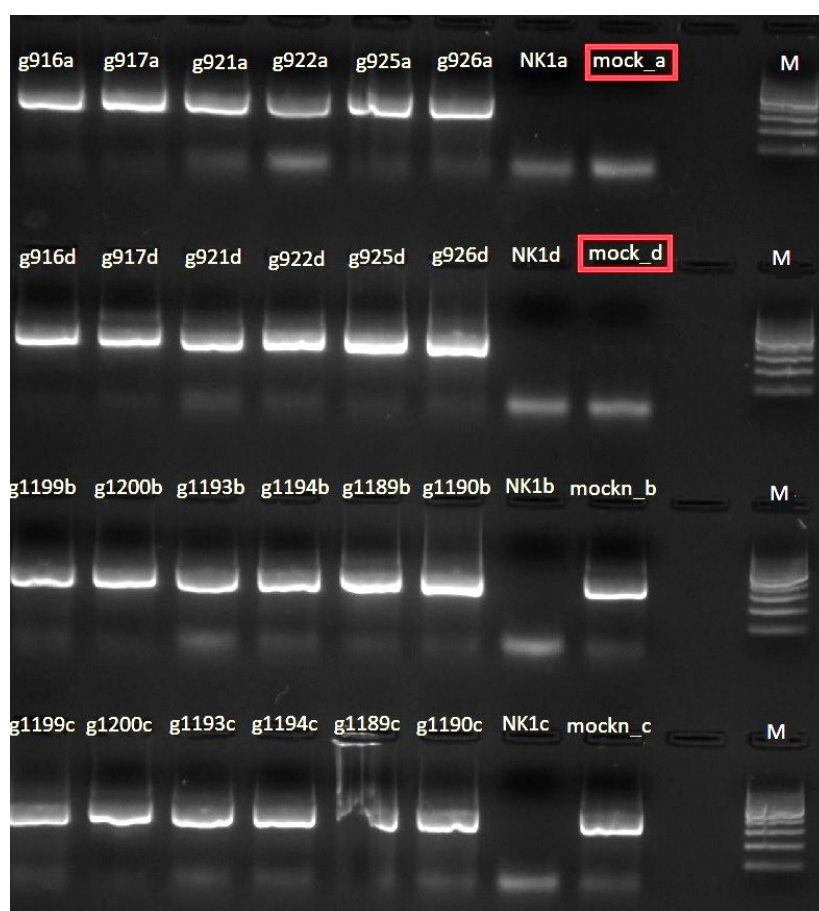
	vzorky celkem	pacienti			vzorky		
		CD	JIA	kontroly	CD	JIA	kontroly
před anti-TNF α	203	37	7	15	148	33	22
po anti-TNF α	63	14	3	-	55	8	-
celkový počet	266	38	7	15	203	41	22

Přibližně ze 100 mg stolice byla izolována celková genomová DNA. Pro ověření přítomnosti bakteriální 16S rDNA byly vzorky analyzovány pomocí real-time PCR za použití specifických primerů k variabilní oblasti V4. Výsledné křivky z kontroly jedné části vzorků jsou uvedeny na Obr. 8.



Obr. 8: Kontrola přítomnosti V4 16S rDNA ve vzorcích – výsledné křivky z real-time PCR. Na obrázku je graf závislosti delta Rn (změna signálu fluorescence vztažené k pasivní referenční kontrole) na počtu cyklů PCR reakce. Zeleně je vyznačena hodnota Ct (prahový cyklus – hodnota cyklu dané křivky, při níž dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí). Červeně označené křivky vzorků g990 a g998 značí jejich částečnou inhibován. Modře označená křivka představuje vzorek negativní kontroly - protože se jedná o detekci pomocí SybrGreen, může se jednat jak o specifickou amplifikaci DNA z reagentů, tak i o nespecifický vzestup signálu běžný při tomto druhu detekce.

Na základě těchto dat byly inhibované vzorky naředěny v poměru 1:4 (vzorek:injekční voda), popřípadě málo koncentrované vzorky (pod 24 Ct) byly znovu izolovány. Ověřené izoláty DNA byly použity k PCR reakci k přípravě sekvenačních knihoven podle Kozich et al. (2013), při níž byly fragmenty V4 16S rDNA označeny indexy a adaptéry. Náhodně vybrané produkty PCR, negativní kontroly a mock komunity byly vizualizovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Fotografie jednoho z výsledných gelů je na Obr. 9. Pokud vzorek na agarózovém gelu nebyl viditelný, byl znovu připraven reakcí PCR se stejnou kombinací indexovaných primerů jako v předešlé reakci, popřípadě byl ze sekvenace vyřazen.

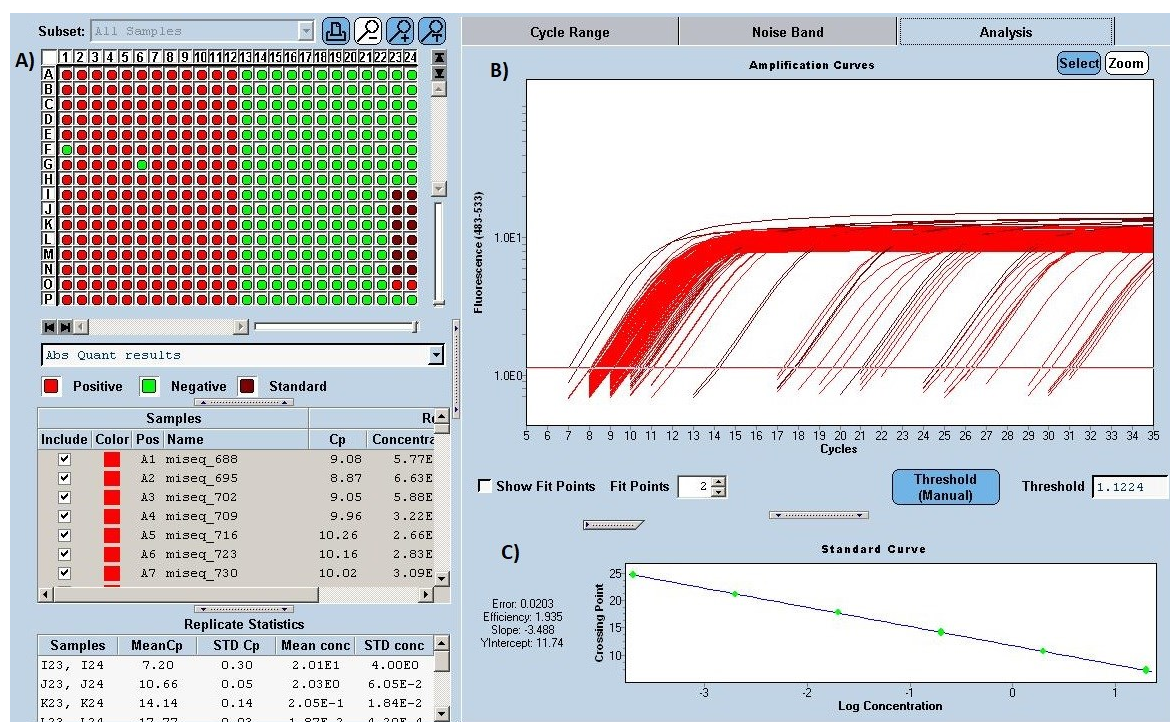


Obr. 9: Agarózový gel po elektroforéze – kontrola amplifikace fragmentů V4 16S rDNA. Na gel bylo nanášeno šest náhodných produktů PCR, pozitivní (mock) a negativní kontrola po PCR ze všech čtyř PCR desek (za číslem vzorku označeny písmeny a-d). Pozitivní kontroly z desky a a d (červeně) se nepodařilo amplifikovat, proto byla jejich amplifikace opakována. NK – negativní kontrola, M - marker

Produkty PCR reakce byly následně přečištěny a ekvalizovány na přibližně stejnou koncentraci (ekvimolární zastoupení). Dva ze tří sekvenačních běhů byly zpracovány pomocí metod AMPure XP a KAPA kvantifikační PCR, třetí běh pak metodou SequelPrep. Budou zde ukázány příklady výsledků z obou způsobů ekvalizace.

1) AMPure XP a KAPA qPCR

Produkty PCR byly přečištěny od zbylých primerů a dalších složek reakce metodou navázání DNA na paramagnetické kuličky (AMPure XP). Každý přečištěný produkt byl 10 000× naředěn a kvantifikován komerční sadou KAPA Library Quantification kit. Výsledné křivky kvantifikační PCR jsou zobrazeny na Obr. 10.

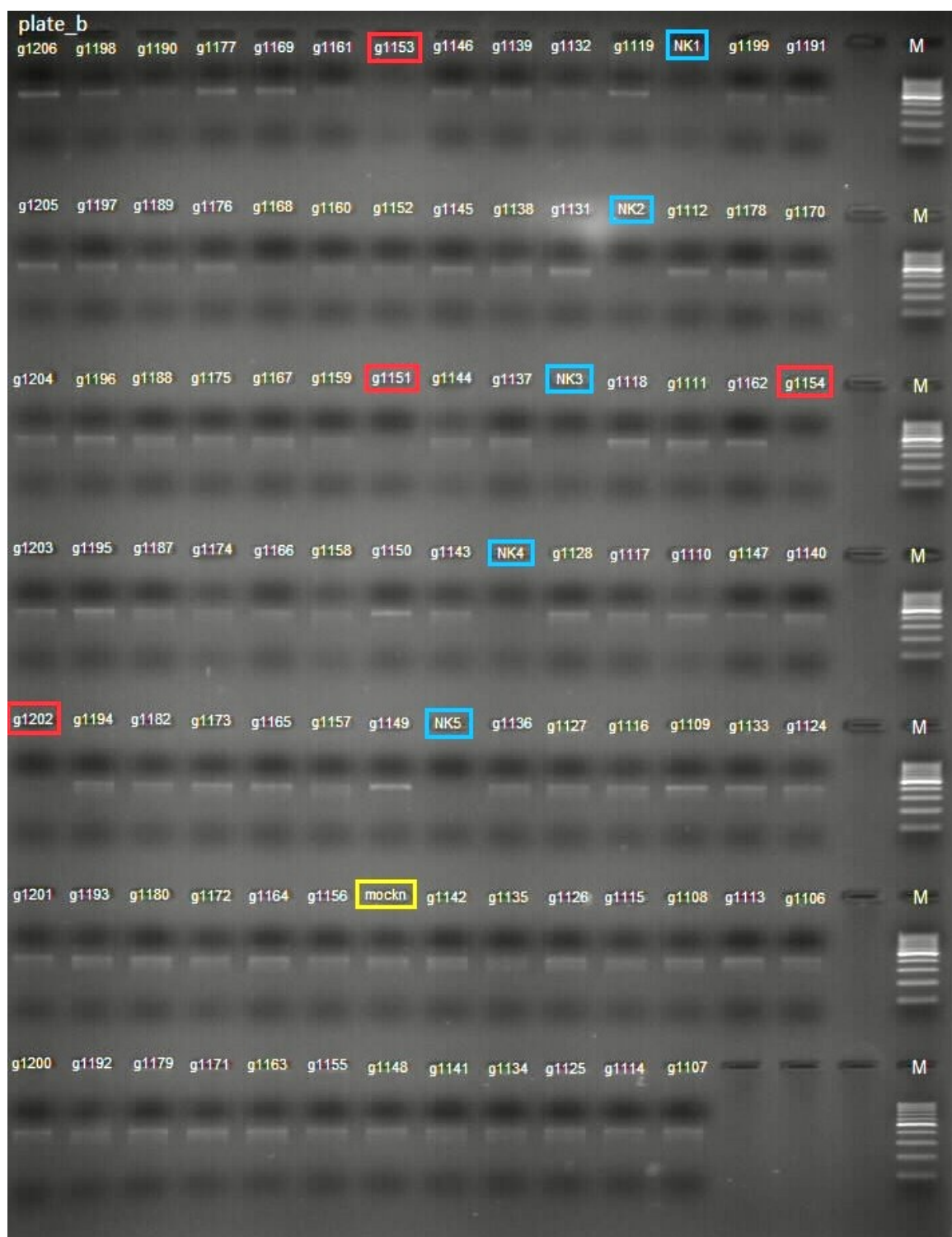


Obr. 10: Kvantifikace PCR produktů V4 16S rDNA pomocí KAPA qPCR. A) Rozložení kvantifikovaných vzorků v 384-jamkové destičce v cyklu. Byly pipetovány pozice 1-12 a A-P (jedna PCR deska v duplikátu) a standardy (hnědě). Červené pozice jsou pozitivní (obsahují DNA fragmenty), zeleně jsou negativní (vzorek, ve kterém nebyla detekována DNA v obou duplikátech, je ze sekvenace vyřazen). B) Amplifikační křivky – graf závislosti detekované fluorescence na čísle cyklu PCR reakce. C) Standardní křivka vzniklá na základě fluorescence vztažené ke koncentraci měřeného standardu.

Na základě standardní a amplifikační křivky jsou programem vypočteny koncentrace jednotlivých vzorků, na jejichž základě je zvolena diluční strategie. Podle ní jsou vzorky naředěny a následně smíchány do poolu ve stejném molárním množství.

2) SequalPrep

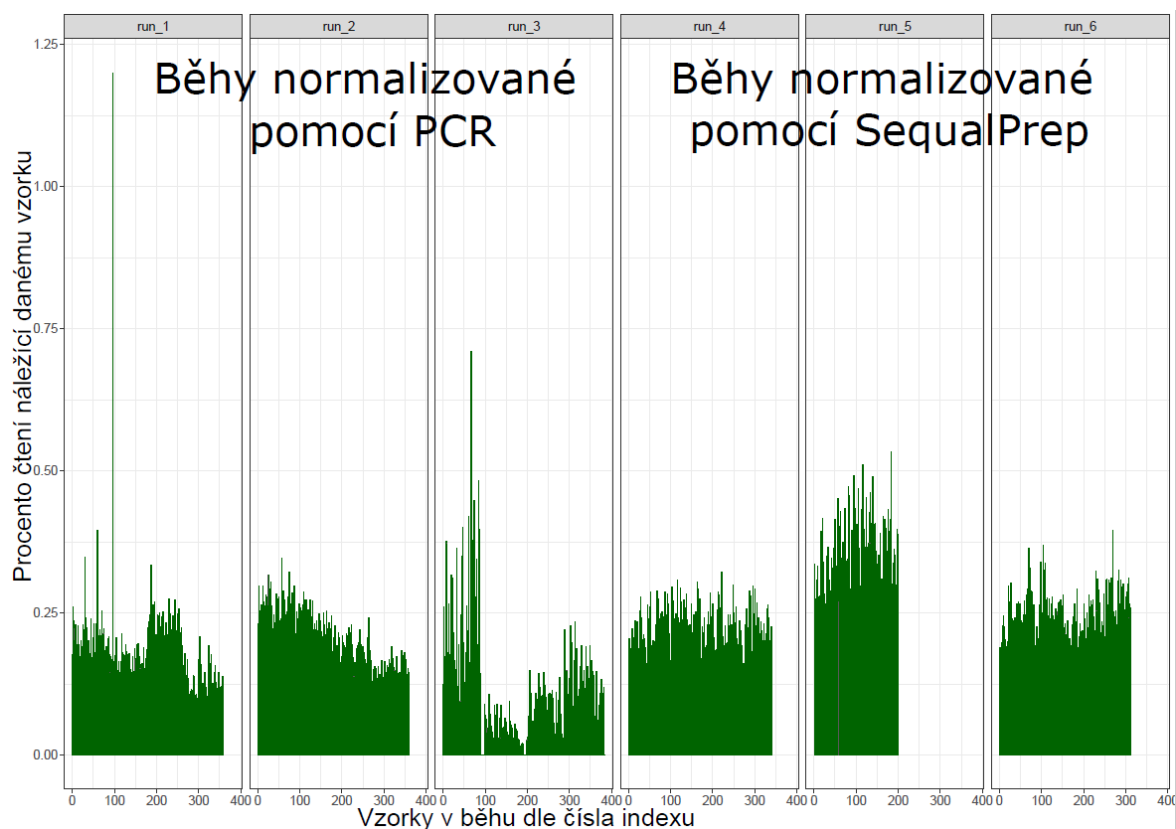
Produkty PCR byly přečištěny a ekvalizovány metodou SequalPrep na robotu Biomek 4000. Všechny ekvalizované produkty byly vizualizovány na agarosové elektroforéze. Jeden z výsledných gelů je zobrazen na Obr. 11 (str. 53).



Obr. 11: Agarózový gel po elektroforéze – ekvalizované vzorky V4 16S rDNA metodou SequalPrep. Pozitivní kontrola – mock komunita (žlutě), negativní kontroly (modře), vzorky, které se nepodařilo ekvalizovat (červeně), M-marker.

Z ekvalizovaných vzorků byl následně smícháním stejných objemů připraven pool. Vzorky, které se nepodařilo ekvalizovat (nizký obsah DNA) byly ze sekvenace vyřazeny.

V kapitole 5.3.2 byl popsán postup optimalizace a zavádění nové metody SequalPrep na Robota Biomek. Na základě sekvenčních dat byl připraven graf (Obr. 12) porovnávající účinnost ekvalizace obou metod.



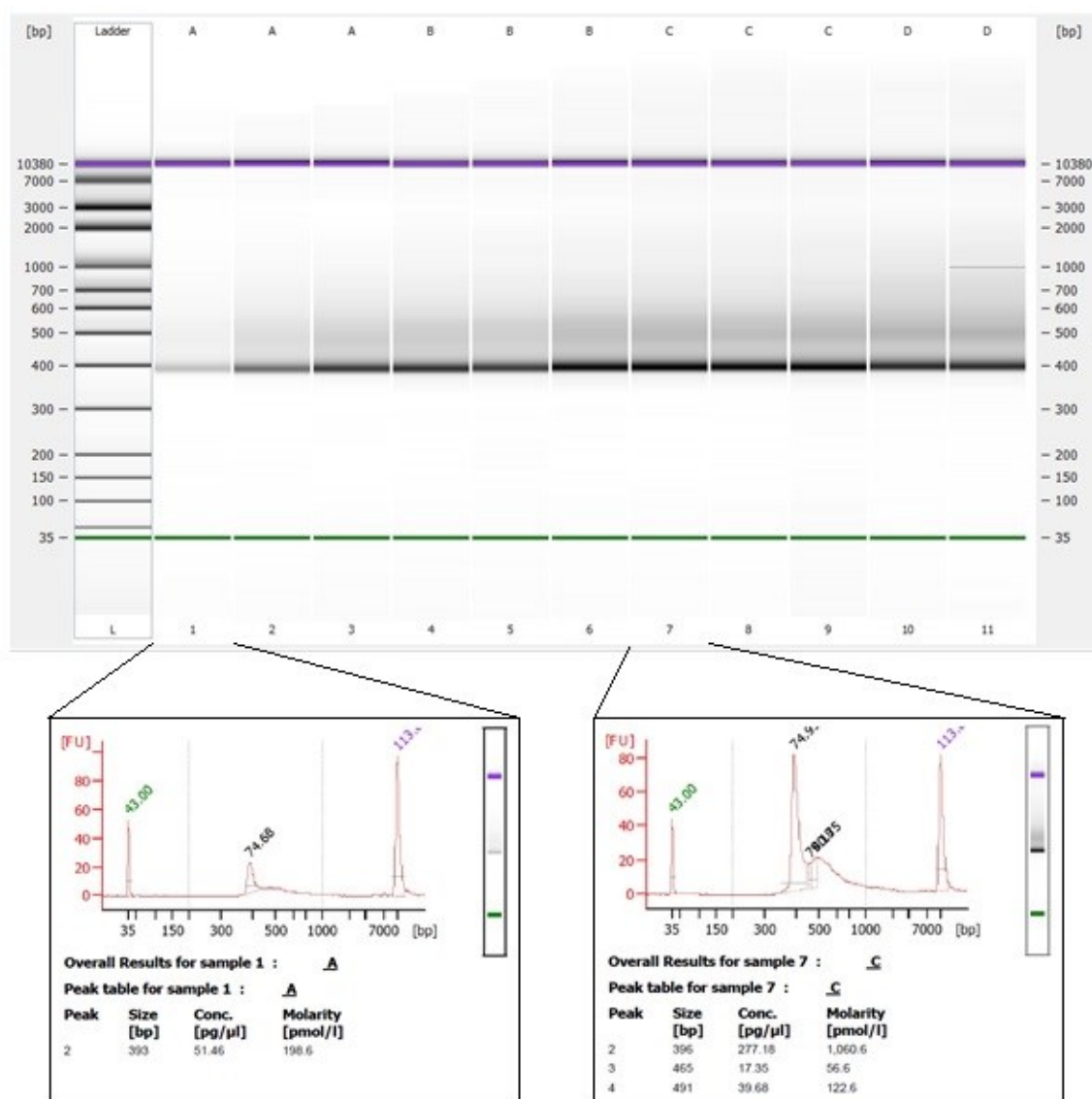
Obr. 12: Graf ukazující příklad srovnání ekvalizace vzorků metodami KAPA qPCR a SequalPrep. Graf porovnává tři sekvenční běhy normalizované metodou KAPA qPCR a tři sekvenční běhy normalizované metodou SequalPrep. Na vodorovné ose je uveden počet vzorků v běhu, na svislé ose pak procento čtení náležící danému vzorku. Čím je větší molární zastoupení vzorku v sekvenční knihovně, tím více čtení v porovnání s ostatními vzorky poskytuje.

Z grafu je patrné, že metoda SequalPrep poskytuje lépe ekvalizované vzorky, jejichž procenta čtení jsou obdobná. U sekvenčních běhů normalizovaných pomocí KAPA qPCR některé vzorky vyčnívají nad ostatními svým počtem čtení, což je patrně důsledek většího molárního množství daného vzorku v sekvenční knihovně v poměru s ostatními. Dále je z grafu vidět, že některé vzorky se ekvalizací qPCR ztratily a neposkytly žádné anebo jen minimum čtení.

Po ekvalizaci byly ze vzorků každé 96-jamkové desky připraveny pooly, jejichž koncentrace byla měřena na fluorometru Qubit a délka fragmentu metodou automatizované elektroforézy na přístroji Bioanalyzer 2100. Koncentrace poolů ze všech tří sekvenačních běhů jsou uvedeny v Tab. 3. Výsledný gel z automatizované gelové elektroforézy a fluorescenční křivka pro výpočet délky fragmentů DNA v poolu jsou zobrazeny na Obr. 13 (str. 56).

Tab. 3: Koncentrace DNA fragmentů V4 16S rDNA v poolech A až D u sekvenačních běhů 1 až 3.

název poolu	koncentrace DNA (pM)		
	běh 1	běh 2	běh 3
pool A	1 255	1 820	2 405
pool B	1 242	2 351	1 989
pool C	1 414	1 715	2 066
pool D	1 387	2 274	2 266
finální pool	1 387	2 006	1 974



Obr. 13: Gel z automatizované elektroforézy na přístroji Bioanalyzer 2100 z poolů jednoho ze sekvenačních běhů. Grafy závislosti měřené fluorescence na velikosti fragmentu V4 16S rDNA. V horní části je zobrazen gel, na nějž byly naneseny vzorky poolů A až D v triplikátech. Je zde vidět, že velikost fragmentu DNA (nevýraznější proužek) odpovídá cca 400 bp. Přesná velikost fragmentu je vypočtena z dat měření fluorescence a na základě standardu (ladder). Ze závislosti tohoto měření na velikosti fragmentu byly přístrojem vytvořeny grafy v dolní části obrázku.

6.2 Bioinformatická analýza dat

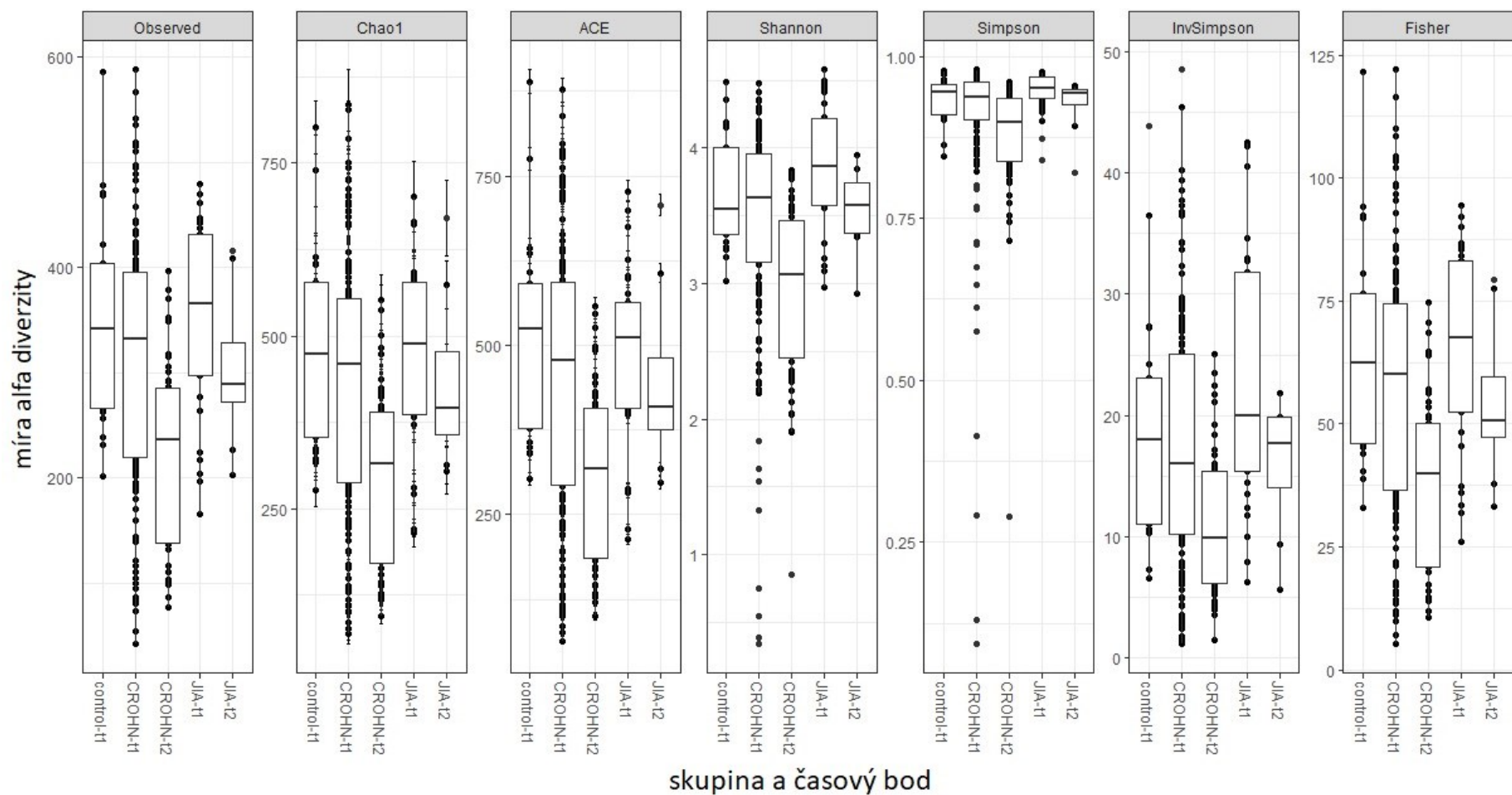
Do analýzy byly zahrnuty všechny sekvenované vzorky kromě mock komunit, které byly kontrolovány odděleně, a negativních kontrol. Jak bylo uvedeno v kapitole 4.3 o odběrech vzorků, byly sekvenovány a následně analyzovány všechny doposud získané vzorky bez ohledu na to, jestli pacient následně podstoupil nebo nepodstoupil terapii anti-TNF α . Zde uvedené výsledky jsou pouze předběžné, protože studie, jejíž součástí je tato diplomová práce, dále pokračuje. Bioinformatická analýza byla provedena jinými členy laboratoře – níže popisují mně dodané výsledky předběžného statistického zpracování.

Po primární analýze dat s použitím pipeline DADA2, byly sekvence taxonomicky zařazeny pomocí databáze SILVA verze 132. Amplikonové sekvenační varianty (ASV, analog k operační taxonomické jednotce OTU) byly dále analyzovány pomocí balíčku *vegan* a *phyloseq* v prostředí programovacího jazyku R. Takto připravená data byla použita k analýze alfa diverzity.

6.3 Alfa diverzita

Nejprve byla hodnocena alfa diverzita, tedy druhovou bohatost a rozmanitost (diverzitu) uvnitř vzorku. K tomu bylo použito několik indexů (Obr. 14, str. 58).

Byly porovnány skupiny (kontroly, pacienti s Crohnovou chorobou a pacienti s juvenilní idiopatickou artritidou) a vzorky odebrané před a po podání terapie anti-TNF α (čas t1 a t2). Měření podle indexu Chao1, který odhaduje diverzitu na základě počtu druhů OTU, popisuje překvapivě velké rozpětí alfa diverzity u skupiny CROHN-t1. Pokles průměrné alfa diverzity asociovaný s podáním anti-TNF α je zřejmý a signifikantní u pacientů s CD, ale není signifikantní u pacientů s JIA. O kauzalitě se ze současné analýzy nelze vyjádřit.



Obr. 14: Graf hodnotící alfa diverzitu. Hodnocení bylo provedeno na základě počtu OTU (observed) a indexů Chao1 (tj. index dle Chaové), ACE, Shannon, Simpson, InvSimpson (tj. inverzní Simpsonův index) a Fisher. Na ose x jsou uvedeny sledované skupiny (kontrola a pacienti s CD a JIA) a čas odběru v závislosti na podání terapie anti-TNF α (před terapií – t1, po terapii – t2). Na ose y je uvedeno měřítko alfa diverzity. Body znázorňují jednotlivé vzorky. Kvartilový graf uvádí rozptýlenost dat, přičemž středová vodorovná čára znázorňuje medián.

Podobné informace podává také Shannonův index (Rovnice 1) hodnotící uspořádanost (entropii) ve vzorku a jeho druhovou bohatost (Borcard et al. 2018). Podle tohoto indexu je zřejmé, že ve skupině CHROHN-t1 je řada vzorků (spodní část grafu), u nichž patrně převažuje jeden taxon nad ostatními (čím více je vzorek druhově bohatý, tím větší je hodnota indexu). Menší rozdíly mezi diverzitou jednotlivých skupin znázorňuje Simpsonův index (Rovnice 2), který udává pravděpodobnost, s jakou dvě náhodně vybrané bakterie budou patřit ke stejnému druhu. Index nabývá hodnot 0 až 1, přičemž hodnota 1 reprezentuje nulovou diverzitu (Borcard et al. 2018).

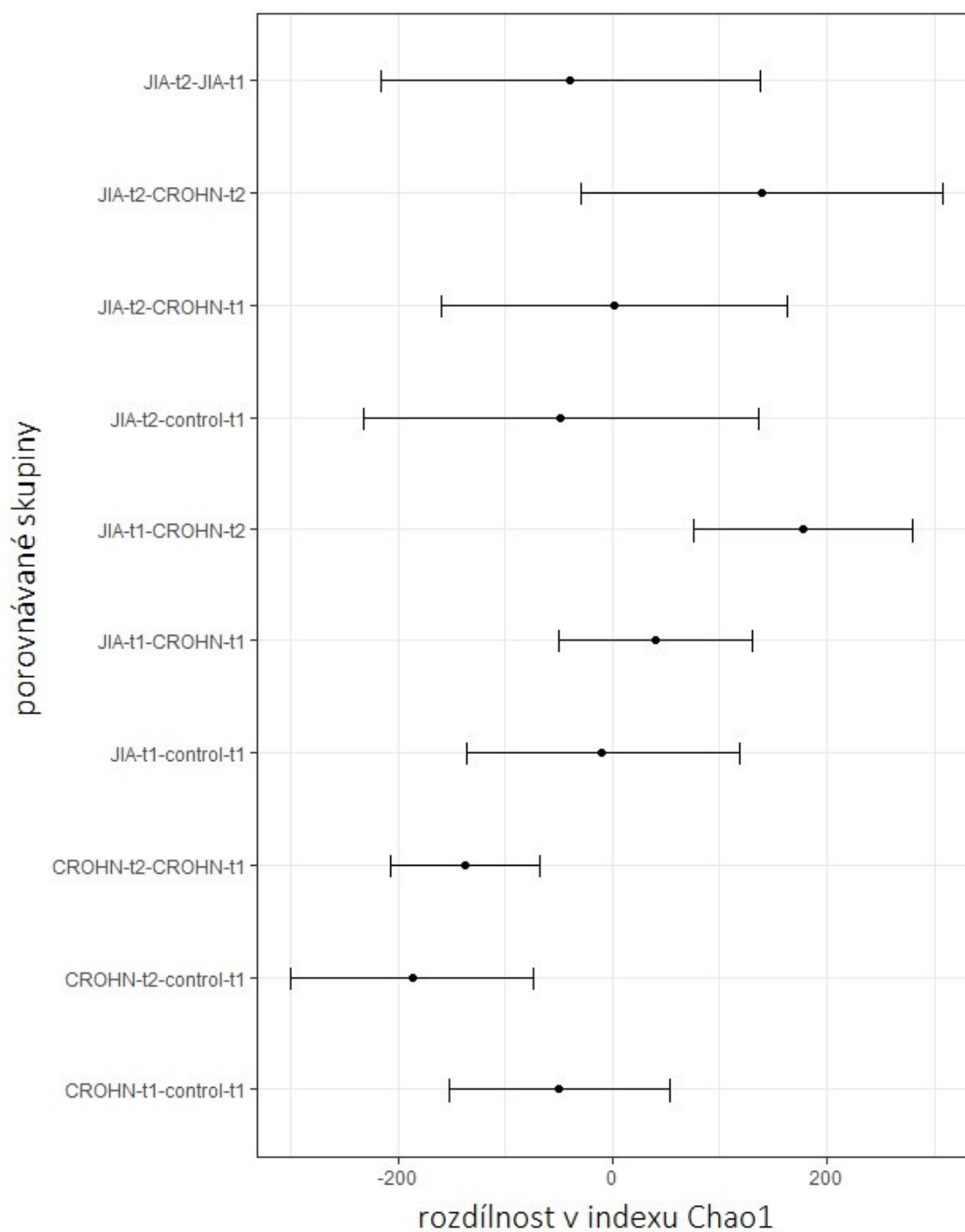
$$H = - \sum_{i=1}^q p_i \log p_i$$

Rovnice 1: Výpočet Shannonova indexu diverzity, kde H - Shannonův index, q - počet druhů, p_i - relativní četnost mezi druhy, převzato z (Borcard et al. 2018)

$$\lambda = \sum_{i=1}^q \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

Rovnice 2: Výpočet Simpsonova indexu, kde λ - Simpsonův index, q - počet druhů, n_i - hojnost i -tého druhu, n - celková hojnost všech druhů, převzato z (Borcard et al. 2018)

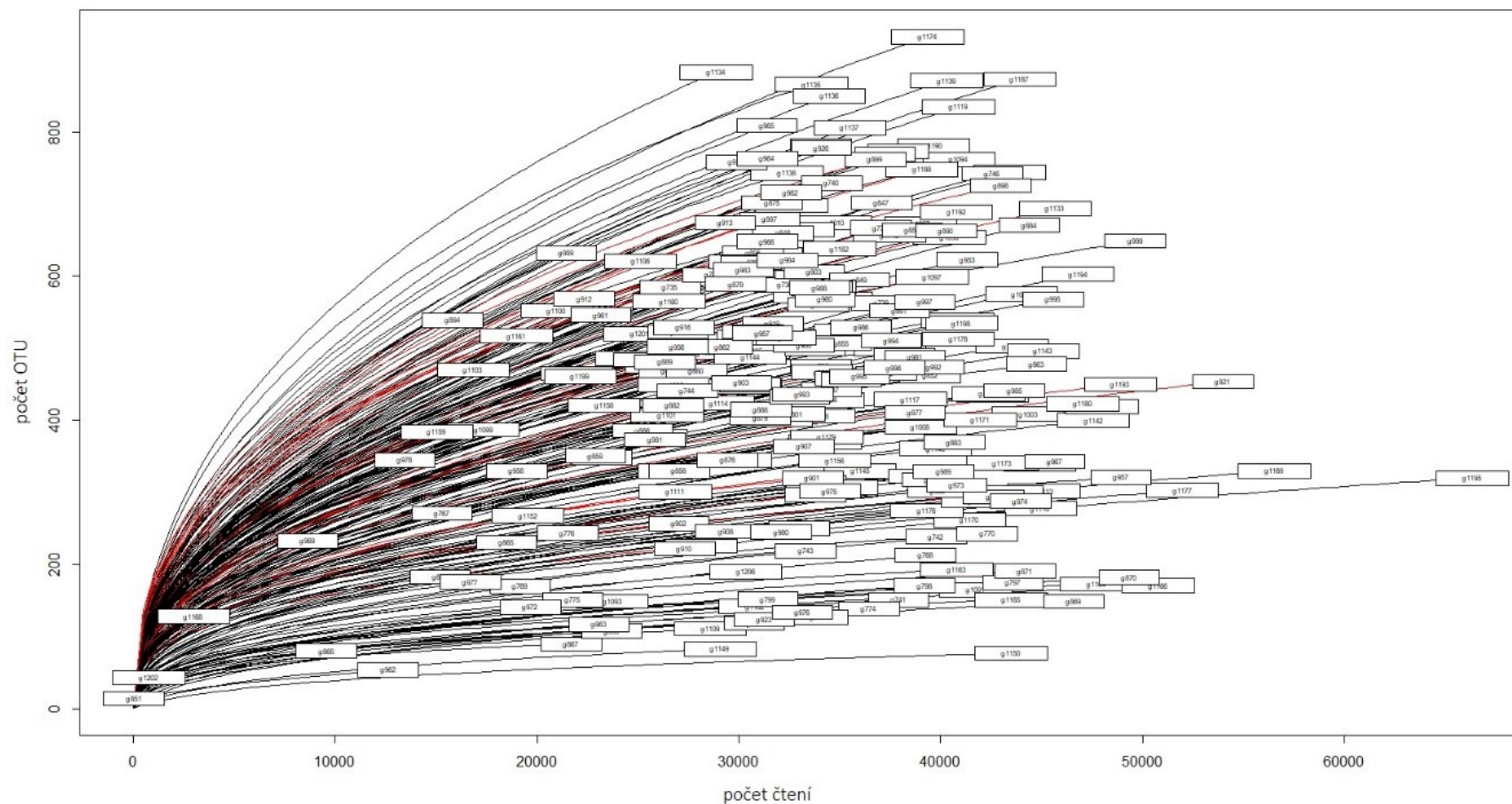
Vliv skupiny a léčby anti-TNF α na alfa diverzitu (vypočítanou podle indexu Chao1) byl zjednodušeně testován analýzou variance (ANOVA), ačkoli ta ignoruje, že se nejedná o nezávislá měření (použití příslušných metod pro opakovaná longitudinální měření je mimo rozsah této diplomové práce). Následné porovnávání těchto pěti skupin Tukeyho metodou ukázalo, mezi jakými skupinami je rozdíl a která skupina z porovnávané dvojice je za rozdíl zodpovědná. Rozdíl mezi skupinami (Obr. 15, str. 60) byl zřejmý ($p = 2 \cdot 10^{-7}$).



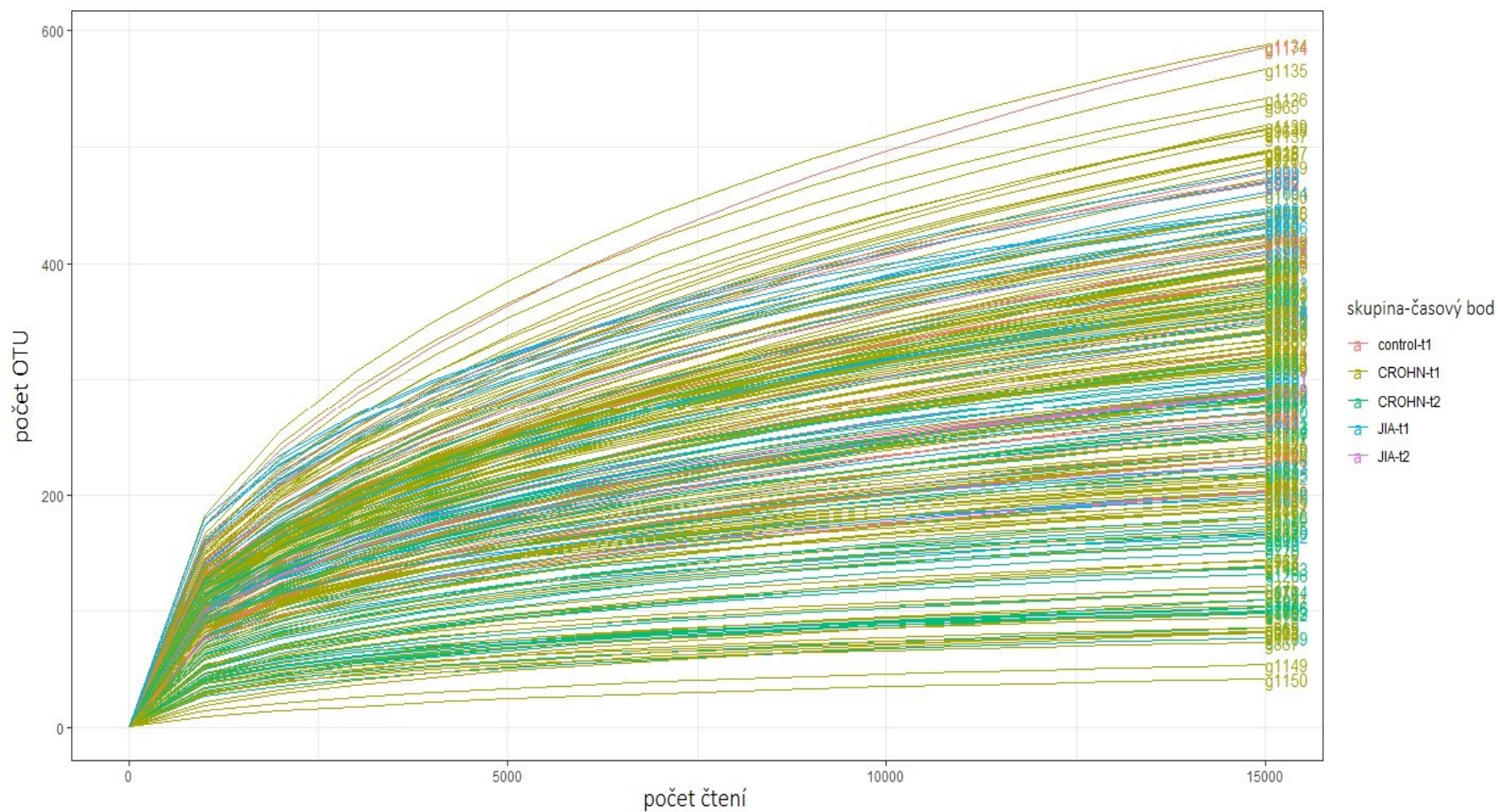
Obr. 15: Výsledek srovnání skupin pomocí Tukeyho metody s 95% intervaly spolehlivosti. Osa x udává relativní rozdíl v alfa diverzitě podle indexu Chao1. Hodnota 0 značí, že dvě skupiny se od sebe v indexu Chao1 nelišily. Na ose y jsou uvedeny dvojice porovnávaných skupin. Úsečka v grafu zobrazuje 95% interval spolehlivosti (confidence interval, čím kratší, tím vyšší spolehlivost odhadu rozdílu mezi skupinami). Signifikantní rozdíl vykazují skupiny, jejichž úsečka intervalu spolehlivosti nezahrnuje 0 na ose x. Pokud je odhad vlevo, pak levý člen dvojice má nižší hodnotu indexu a naopak.

Z grafu vyplývá, že signifikantní rozdíl vykazují dvojice: JIA-t1-CROHN-t2, CROHN-t2-CROHN-t1 a CROHN-t2-control-t1. Porovnání dvojice JIA-t1-CROHN-t2 o ničem nevypovídá, protože se jedná o různá onemocnění a různé časové body související s léčbou. Signifikantně nižší hodnota indexu Chaové u pacientů s Crohnovou chorobou po podání anti-TNF α (CROHN-t2) proti těmto pacientům před aplikací léku (CROHN-t1) je příkladem změny v alfa diverzitě u pacientů s CD po podání terapie anti-TNF α . Spolu s rozdílem u dvojice CROHN-t2-control-t1 lze říci, že terapie těmito protilátkami by mohla měnit alfa diverzitu bakteriomu u CD, nebo že jiné (zavádějící) faktory jsou s touto terapií asociované (řádné párové multivariantní testování bude předmětem pozdějších analýz). Vliv terapie u CD v porovnání s vlivem u JIA nelze objektivně hodnotit. Jak je z grafu u dvojice JIA-t2-CROHN-t2 vidět, interval spolehlivosti je velice široký podobně jako u všech dvojic zahrnující skupinu JIA-t2.

S alfa diverzitou úzce souvisí rarefakční křivka (Obr. 16, str. 62). Se stoupající hloubkou sekvenace by měl stoupat počet taxonů pozorovaných alespoň jednou (sběratelská křivka), přičemž by se křivka měla oplošťovat. To se v tomto případě také dělo. Dále byl sledován mimořádně velký rozptyl počtu pozorovaných taxonů u pacientů s Crohnovou chorobou. Maximální počet identifikovaných taxonů ve vzorku byl cca 900 OTU, maximální počet čtení se blíží k 70 000. Při desíti tisíc čtení bylo identifikováno maximálně 500 různých taxonů (Obr. 17, str. 63).



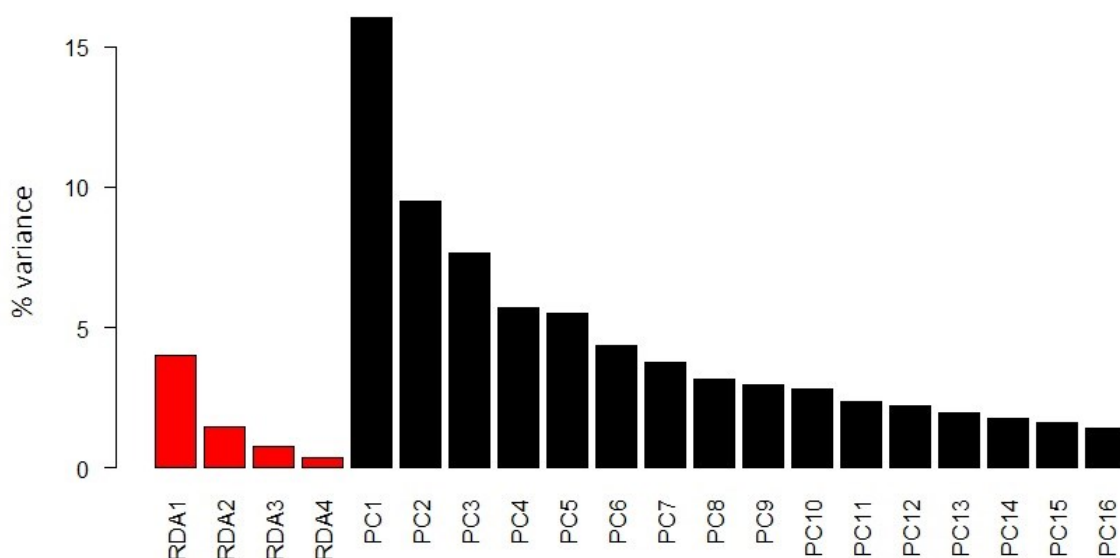
Obr. 16: Rarefakční křivka při plné sekvenační kapacitě. Na ose x je uveden počet čtení, na ose y počet identifikovaných OTU.



Obr. 17: Rarefakční křivka se zarovnáním na 15 000 čtení. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny (červená - kontrola, žlutá - pacienti s Crohnovou chorobou před léčbou, zelená - pacienti s CD po léčbě, modrá - pacienti s juvenilní idiopatickou artritidou před léčbou, růžová - pacienti JIA po léčbě).

Po zhodnocení alfa diverzity (která bezpodmínečně vyžaduje nefiltrovaná data) byla provedena filtrace souboru a byly odstraněny vzácné taxony (ty, jejichž frekvence alespoň v 10 vzorcích nedosáhla alespoň cca 0.1%). Bakteriom byl také aglomerován na několika úrovních - rod, čeleď, třída, kmen - a opět rarefikován (na 10 000 čtení). S takto filtrovaným souborem probíhaly všechny další analýzy.

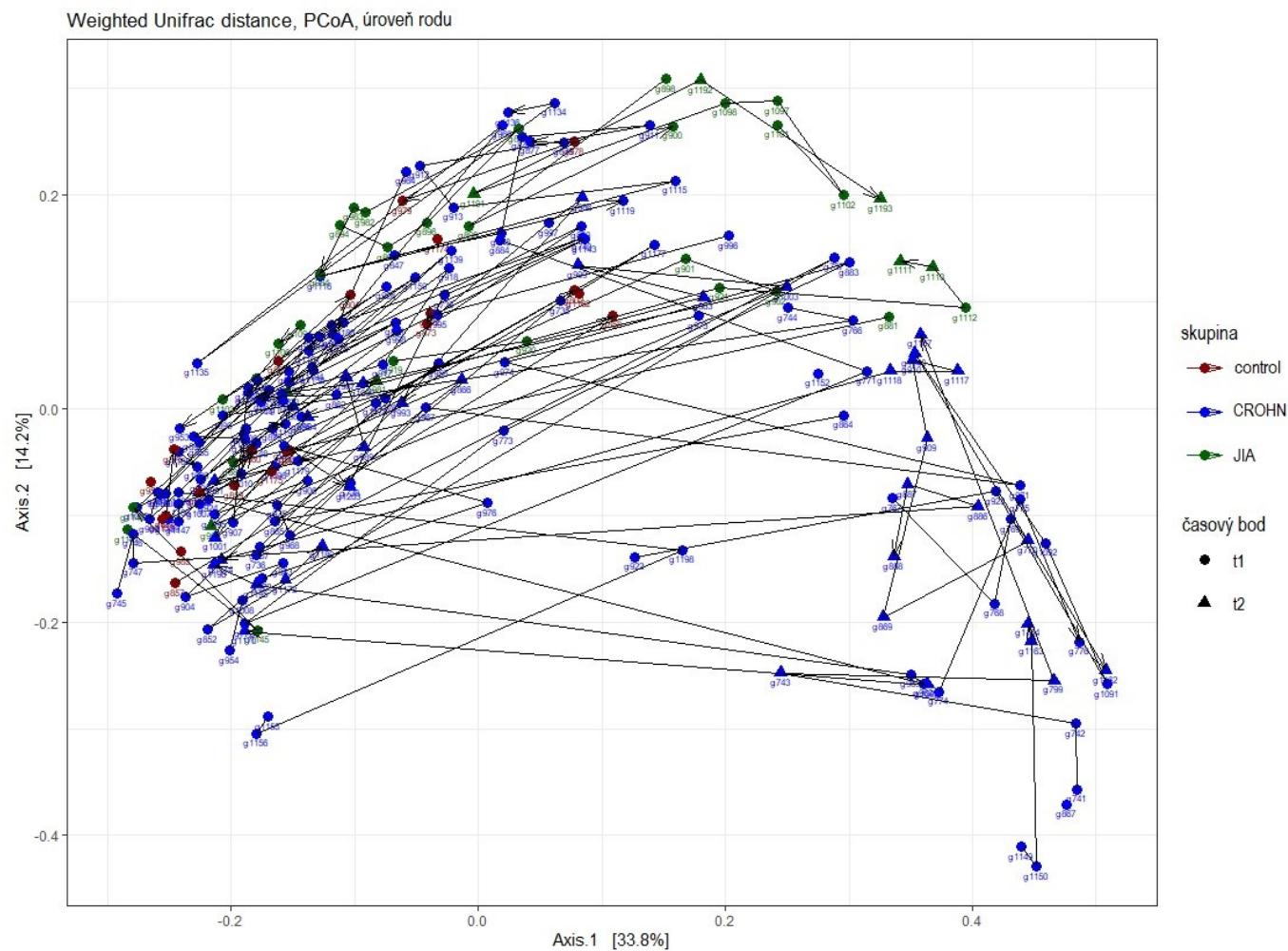
Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly popsány pomocí metod k redukci dimenzionality. Složení bakteriálních komunit bylo testováno na to, zda odráží příslušnost vzorku ke skupině nebo časovému údobí. Transformation-based redundancy analysis (tb-RDA) ukázala, že oba prediktory jsou vysoce signifikantní a že vliv časování vzorku se mezi skupinami liší - výrazný je jen u pacientů s CD (Obr. 18, str. 65). Prediktory dohromady ale nevysvětlují mnoho z celkové variability bakteriomu (Obr. 19, str. 66). Z analýzy vyčnívá asociace složení bakteriomu se zavedením terapie anti-TNF α u Crohnovy choroby (Obr. 18, šipka). Permutačními metodami byl testován vliv jednotlivých prediktorů a bylo zjištěno, že jak skupina (CD, JIA nebo kontroly; $p < 0.001$), tak časování vzorku (před nebo po anti-TNF-alfa, $p < 0.001$) jsou signifikantními prediktory složení bakteriomu, přičemž jejich interakční člen naznačuje, že mezi CD a JIA se vliv anti-TNF na bakteriom může lišit ($p = 0.071$). Přesnější modely budou zpracovány jen ze vzorků těsně před a těsně po podání anti-TNF-alfa v pozdějších fázích studie.



Obr. 19: Screeplot objasněné variance jednotlivými ordinačními osami. Červeně jsou *constrained* osy (první dvě $P < 0.01$, další dvě nesignifikantní), černě *unconstrained* osy. Je zřejmé, že příslušnost k pacientským skupinám a časování vzorku objasňuje jen malou část variance bakteriomu (max. 4 %), ačkoli je jejich vliv vysoce statisticky signifikantní.

6.4 Beta diverzita

Ordinačními metodami byla hodnocena i beta diverzita (rozdíly ve složení bakteriomu mezi vzorky). Z filtrovaného souboru bylo provedeno metrické multidimenzionální škálování (MDS či PCoA) vážené distance UNIFRAC. MDS (PCoA) je prostředkem vizualizace míry podobnosti jednotlivých případů (vzorků) datového souboru. Vážená distance UNIFRAC (weighted UNIFRAC distance) srovnává vzorky na základě množství bakteriálních druhů a vzdálenosti taxonů ve fylogenetickém stromu. Vzdálenost vzorků v grafu MDS následně udává, do jaké míry jsou vzorky rozdílné a které jsou si navzájem podobné. Graf (Obr. 20, str. 67) ukazuje výsledek této analýzy pro úroveň rodu. Symboly rozlišují vzorky před a po podání anti-TNF-alfa a barvou odlišuje sledované skupiny. Vzorky shodného subjektu jsou spojeny čarami opatřenými šipkou ve směru času.



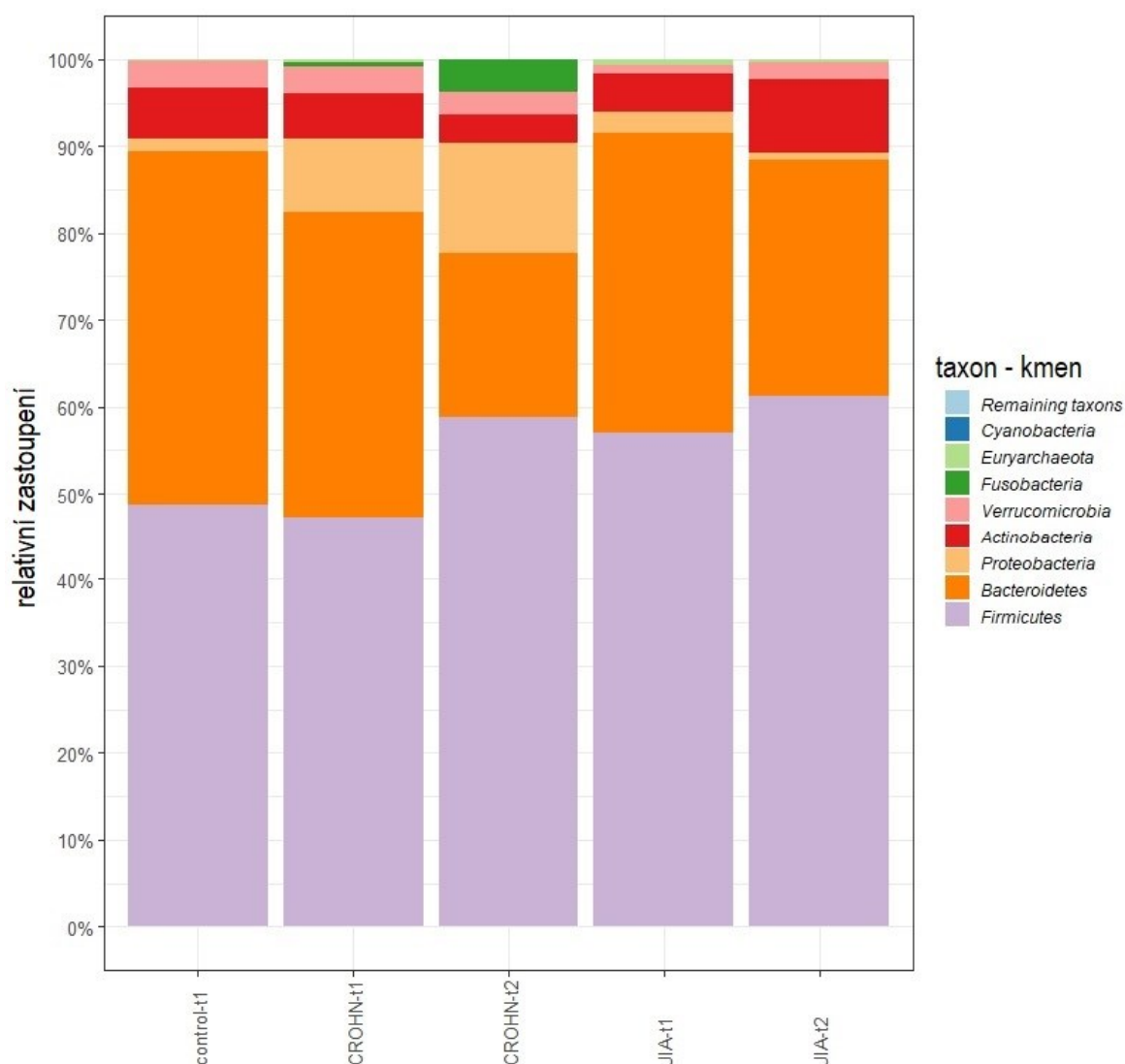
Obr. 20: Metrické multidimenzionální škálování vážené distance UNIFRAC. Symboly rozlišují vzorky před a po léčbě anti-TNF α , barevně jsou rozlišeny porovnávané skupiny. Šipka naznačuje posloupnost, jak byly vzorky jednoho subjektu sbírány v čase. Ordinační osa (osa x) vysvětluje 34 % variability mezi vzorky, druhá ordinační osa (osa y) přidává dalších 14 % variability.

První ordinační osa vysvětluje cca 34 % variability, zatímco druhá přidává 14 %. Z rozložení vzorků je zřejmé, že mezi pacienty s Crohnovou chorobou se vyskytuje relativně dobře oddělený cluster vzorků daleko od ostatních (vpravo dole), přičemž do tohoto clusteru vstupují a z něj vystupují velmi dynamicky. Jistá část vzorků od pacientů s JIA také vystupuje odděleně (horní část grafu). Kontrolní vzorky od zdravých jedinců se udržují nejvíce pospolu v clusteru v levé části grafu. Z grafického rozložení je zřejmé, že pro optimální rozlišení bude ještě třeba zkoušet vhodné transformace vstupních dat.

Po vizuálním zhodnocení rozdělení vzorků v grafu byl nález separátní skupiny podpořen testováním distance mezi vzorky permutační multivariantní analýzou variance (PERMANOVA) implementovanou v balíčku *vegan* jako funkce *adonis* (výsledná data nejsou uvedena).

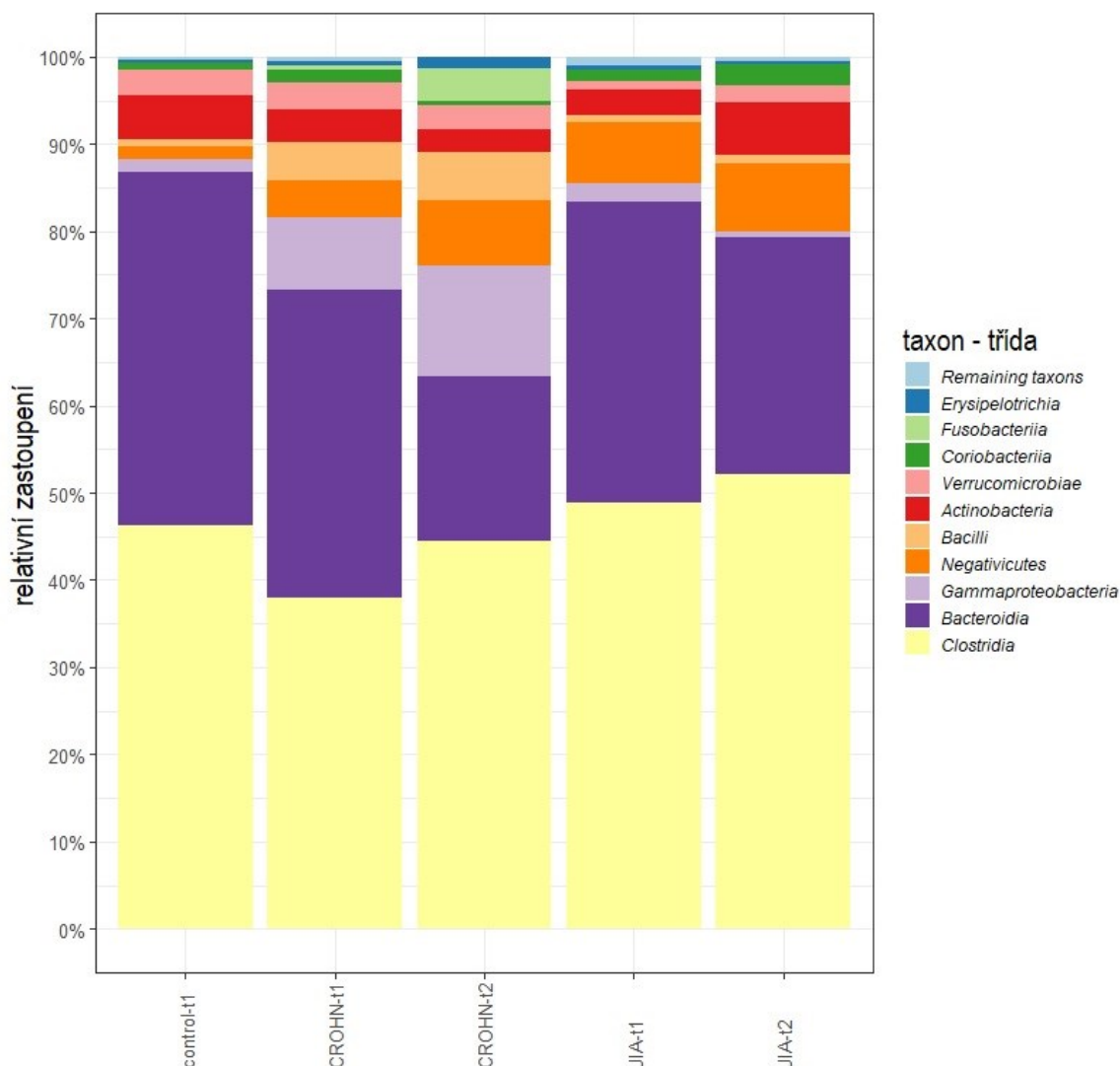
6.5 Relativní zastoupení konkrétních taxonů

Poté byla provedena analýza relativního zastoupení konkrétních taxonů v daných skupinách. Následující grafy udávají zastoupení vždy 10 nejpočetnějších taxonů na taxonomické úrovni kmene (Obr. 21, str. 69), třídy (Obr. 22, str. 70), řádu (Obr. 23, str. 71), čeledi (Obr. 24, str. 72) a rodu (Obr. 25, str. 73).



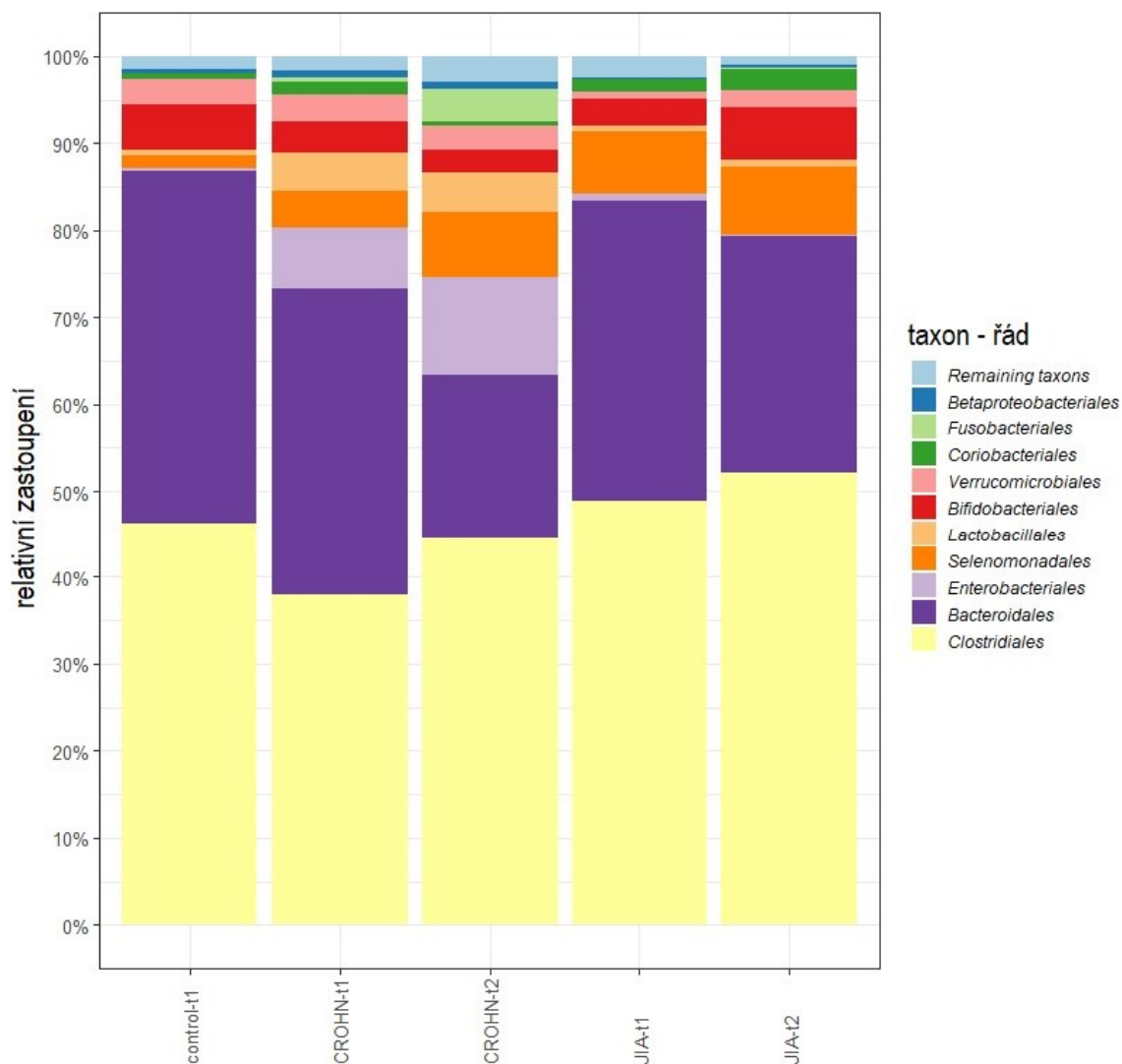
Obr. 21: Graf relativního zastoupení 10 nejhojnějších bakteriálních taxonů u sledovaných skupin na úrovni kmene. Barvy přísluší bakteriálním taxonům podle popisu v legendě.

Na úrovni kmene lze vidět typické složení bakteriomu u skupiny kontrol s dominancí kmenů Firmicutes a Bacteroidetes. Podobné složení vykazují také pacienti s JIA před i po biologické terapii. U pacientů s CD je v porovnání s kontrolami poměrově více bakterií kmene Proteobacteria. Tento rozdíl je ještě znatelnější po podání terapie anti-TNF α u této skupiny, kdy je zřejmý zvýšený podíl bakterií kmene Proteobacteria a Fusobacteria než před léčbou.



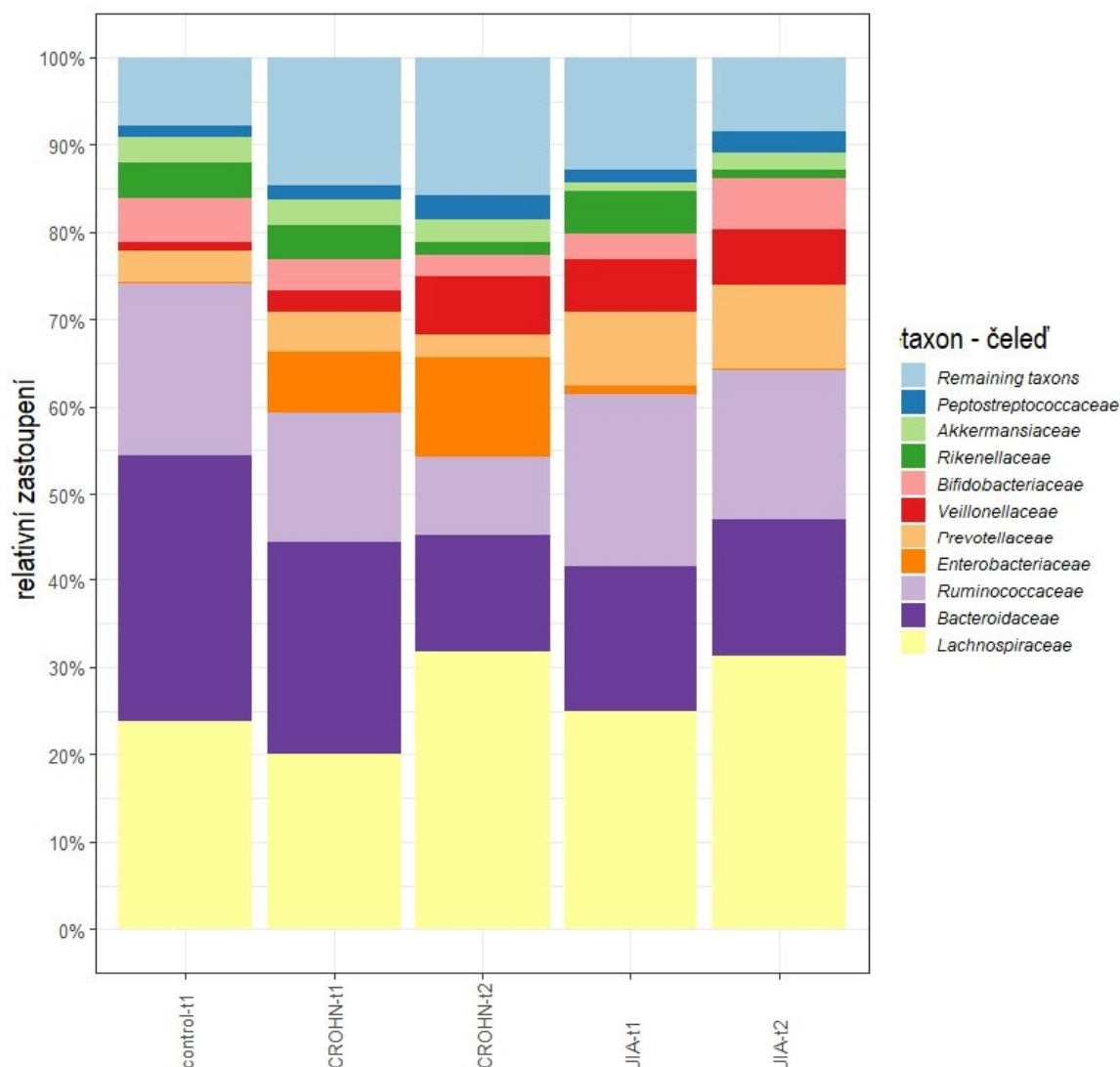
Obr. 22: Graf relativního zastoupení 10 nejhojnějších bakteriálních taxonů u sledovaných skupin na úrovni třídy. Barvy přísluší bakteriálním taxonům podle popisu v legendě.

Na úrovni třídy je opět viditelná velká podobnost ve složení bakteriomu u kontrol a obou skupin JIA. U skupiny CROHN-t1 je zřejmé vyšší relativní zastoupení *Gammaproteobacteria*, *Negativicutes* a *Bacilli*, které se ještě zvyšuje po podání terapie a to na úkor třídy *Bacteroidia*. U skupiny CROHN-t2 je podobně jako u předchozího grafu zřejmý nárůst v zastoupení třídy *Fusobacteriia* a dále mírný vzestup výskytu *Erysipelotrichia*. Skupiny po a před podáním biologika u JIA se mírně liší v relativním zastoupení aktinobakterií.



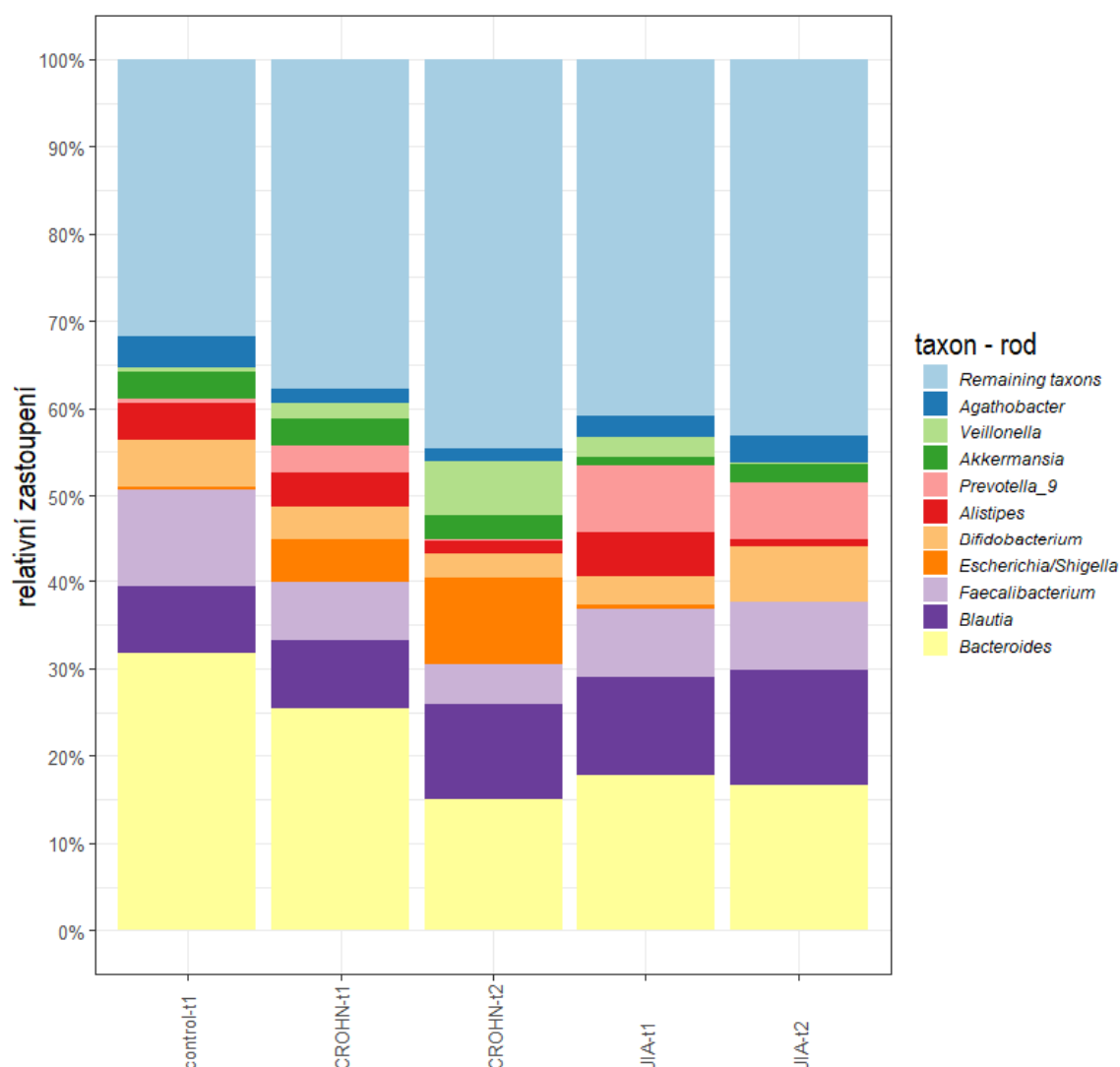
Obr. 23: Graf relativního zastoupení 10 nejhojnějších bakteriálních taxonů u sledovaných skupin na úrovni řádu. Barvy přísluší bakteriálním taxonům podle popisu v legendě.

Na úrovni řádu vidíme drobné odchylky ve složení bakteriomu mezi zdravými kontrolami a skupinami JIA, které vykazují relativně větší zastoupení *Selenomonadales*. Velká změna je opět zřejmá u pacientů s CD oproti kontrole. Podíl *Enterobacteriales*, *Selenomonadales*, *Lactobacillales* je vyšší u CROHN-t1 oproti kontrole, ještě výraznější je pak tento rozdíl u skupiny CROHN-t2. Stejně jako z předešlých grafů vyplývá zvýšení relativního zastoupení *Fusobacteriales* u CD po terapii anti-TNFα.



Obr. 24: Graf relativního zastoupení 10 nejhojnějších bakteriálních taxonů u sledovaných skupin na úrovni čeledi. Barvy přísluší bakteriálním taxonům podle popisu v legendě.

Na úrovni čeledi u skupin JIA je viditelný vyšší podíl *Prevotellaceae* oproti ostatním skupinám. U JIA po terapii se výrazně snížil podíl *Rikenellaceae*. Relativně podobné složení bakteriomu (až na vyšší podíl *Enterobacteriaceae*) vykazují skupiny kontrol a CD před terapií. Výrazný rozdíl je pak zřejmý u skupiny CROHN-t2, která vykazuje zvýšený podíl bakterií čeledi *Veillonellaceae* a *Enterobacteriaceae* a menší podíl *Bacteroidaceae* a *Rimonococcaceae*, které dominují u kontrol.



Obr. 25: Graf relativního zastoupení 10 nejhojnějších bakteriálních taxonů u sledovaných skupin na úrovni rodu. Barvy přísluší bakteriálním taxonům podle popisu v legendě.

V tomto grafu relativního zastoupení bakteriálních taxonů na úrovni rodu je zřejmý vyšší podíl bakterií rodu *Prevotella_9* u skupin s JIA oproti ostatním skupinám. Skupina CROHN-t1 se oproti kontrolám liší vyšším podílem bakterií rodu *Escherichia*. Nárůst je zřejmý po terapii anti-TNF α (skupina CROHN-t2). U pacientů s CD po podání terapie kromě rodu *Escherichia* výrazně narůstá také podíl bakterií rodu *Veillonella*; dále je zřejmý pokles bakterií rodu *Bacteroides* a *Faecalibacterium*.

Četnost taxonů musí být dále testována formálními statistickými testy, aby se dalo říci, které taxony se signifikantně mění v kontextu celkového rozložení ostatních taxonů. Předložené grafy ale naznačují, že minimálně zvýšený výskyt čeledi *Enterobacteriaceae* (resp. rodu *Escherichia*) je skutečný jev.

7 Diskuse

Celkovým cílem práce bylo zkoumat, jak se liší reakce střevního bakteriomu na terapii anti-TNF α u pacientů s CD v porovnání s pacienty s JIA, a to na pozadí dat od zdravé kontrolní skupiny. Protože bylo cílem zjistit, jestli je tato změna důsledkem terapeuticky indukované restituce střeva nebo obecným vlivem léčby, byla zvolena právě skupina pacientů s JIA, jejichž onemocnění nepostihuje primárně střevo.

Základem diplomové práce byla příprava sekvenačních knihoven pro studium bakteriomu. Podařilo se připravit celkem 266 z 270 nasbíraných vzorků od těchto skupin (a to v duplikátech), což považuji za výborný výsledek. Vzorky, které se nepodařilo připravit, byly buď špatně odebrané (místo stolice vzorek obsahoval krvavý hlen) nebo inhibované i po naředění, což znemožnilo amplifikaci jejich DNA. Dostatečné zkušenosti s řešením inhibice v PCR reakcích mám zejména z přípravy sekvenační knihovny ze vzorků stolic myší, u kterých byla indukována kolitida podáváním dextran sulfátu sodného, který inhibuje veškeré PCR reakce. Ve zmiňované předchozí studii jsem si osvojila detekci inhibice a strategii jejího řešení, včetně titrace sperminu, látky, která odstraňuje inhibiční efekt dextran sulfátu blíže nespecifikovaným mechanismem (Krych et al. 2018).

Ekvalizace vzorků pro vytvoření knihovny byla provedena dvěma metodami (KAPA kvantifikační PCR a komerční sadou SequalPrep). Metoda SequalPrep byla nově zavedena do naší laboratoře, proto musela být řádně otestována její účinnost. Výsledky toho testování jsou zobrazeny na grafu (Obr. 12, str. 54) porovnávajícím procenta čtení pro jednotlivé vzorky a to celkem v šesti příkladech sekvenačních běhů (tři běhy byly ekvalizovány metodou qPCR a tři metodou SequalPrep). Metoda SequalPrep poskytuje zcela přesvědčivě vyrovnanější poměry počtů čtení u sekvenovaných vzorků a data z těchto sekvenačních knihoven mohou být považována za relativně přesnější z důvodu podobné hloubky čtení sekvencí každého ze vzorků. Na základě těchto výsledků je tato metoda používána pro ekvalizaci všech sekvenačních běhů pro testování bakteriomu.

Z dodaných výsledků statistického zpracování bakteriomových dat, ačkoli se jedná o předběžné analýzy ještě probíhající studie, zasluhují pozornost analýzy alfa a beta diverzity, stejně jako kompoziční grafy průměrného bakteriomu u jednotlivých skupin pacientů.

Obr. 14 zobrazuje graf hodnocení alfa diverzity vzorků sledovaných skupin na základě několika statistických indexů (index Chao1, Shannonův či Simpsonův index). Z grafů vyplývá velké rozpětí v alfa diverzitě u skupiny pacientů s CD před terapií protilátkami anti-TNF α . To může být způsobeno tím, že byly analyzovány všechny vzorky poskytnuté touto skupinou, tedy i od pacientů, jejichž stav se za dobu sledování nezhoršil natolik, aby museli podstoupit biologickou léčbu. Právě závažnost jejich stavu se ve skupině velmi liší – a data o stupni postižení nejsou v současné analýze zahrnuta. Dá se předpokládat, že vzorky s nízkou alfa diverzitou (v dolní části grafu např. u indexu Chao1) budou od pacientů s těžkým průběhem onemocnění.

Dále z této analýzy vyplývá pokles průměrné alfa diverzity asociovaný s podáním léčby anti-TNF α . Tento pokles je signifikantní u skupiny s CD, ale ne u pacientů s JIA. Není jasné, zda je to jen z důvodu nízkého počtu sledovaných subjektů (resp. jejich vzorků) ve skupině JIA-t2, nebo zda bude diverzita shodná i v budoucí analýze celé studie. Pokles diverzity u pacientů s CD po léčbě anti-TNF α je v rozporu se studií Wang et al. (2018), která naopak popisuje nárůst diverzity po biologické terapii. Příčinou zřejmě bude fakt, že v této skupině byli zahrnuti i pacienti, kteří zatím nepodstoupili alespoň tři dávky terapie, po nichž se obvykle dostaví klinický účinek. Pokud je tato domněnka správná, výsledky vypovídají o tom, že bakteriom u pacientů se závažným stavem skutečně vykazuje nízkou alfa diverzitu, protože tuto terapii podstupují zejména pacienti s těžkým průběhem nemoci nereagující na jinou léčbu. Odpověď poskytne řádná analýza po sebrání dalších vzorků – v té bude správně zohledněn opakovaný charakter odběru vzorků od téhož pacienta, stejně jako korelační struktura dat (mikrobiomy vzorků odebraných po sobě se u pacienta budou patrně lišit méně, než mikrobiomy vzorků odebraných ve větších časových odstupech). Statistik projektu plánuje pro tyto analýzy použít modely smíšených efektů a zobecnělé odhadovací rovnice.

Vliv terapie anti-TNF α na mikrobiom u IBD a pacientů s revmatickými onemocněními sledovala studie od autorů Aden et al. (2019). Ta hodnotila vzorky stolice odebírané od pacientů 24 hod před zahájením léčby, a poté po 2, 6 a 30 týdnech terapie anti-TNF α . Jejich výsledky popisují signifikantní zvýšení diverzity u pacientů s IBD až po 30 týdnech léčby a žádný posun v alfa diverzitě u pacientů s revmatickými onemocněními. Na základě těchto poznatků je možné, že i když budeme hodnotit skupiny pacientů před a po tří měsíční terapii anti-TNF α , tak rozdíl v posunu diverzity u pacientů s CD směrem

k diverzitě zdravých kontrol nemusí být signifikantní vlivem krátké léčby, resp. krátkodobého sledování subjektů při léčbě. Jestli je domněnka správná, se ukáže až na základě analýzy konečných dat ze studie, se zahrnutím pouze těch pacientů, kteří podstoupili tří-měsíční léčbu.

Informace o velkém rozsahu alfa diverzity u pacientů s CD poskytuje i graf rarefakční křivky se zarovnáním na 15 000 čtení (Obr. 17). Stejně tak jako již diskutované grafy i graf redundanční analýzy (RDA) vlivu prediktorů (skupiny a podání léčby) na diverzitu na Obr. 18 poskytuje informace o změně alfa diverzity bakteriomu u skupiny s CD asociované s podáním terapie anti-TNF α .

Dále byla hodnocena beta diverzita. Graf (Obr. 20) metrického multidimenzionálního škálování vážené distance UNIFRAC popisuje na základě ordinačních os míru variability mezi vzorky a blízkostí bodů graficky ukazuje jejich podobnost. Z rozložení vzorků je patrné, že skupina s CD vykazuje vysokou variabilitu v bakteriomu, což již bylo diskutováno u hodnocení alfa diverzity. Dále je na grafu vidět oddělený cluster vzorků skupiny CD, jehož složení se podle časové posloupnosti odběrů vzorků dynamicky mění. Podle vizuálního hodnocení lze říci, že v tomto clusteru převažují vzorky po terapii anti-TNF α , což poukazuje na již diskutovanou změnu složení bakteriomu u pacientů s CD v souvislosti s biologickou léčbou. Také část skupiny JIA je umístěna v odděleném clusteru, přičemž se jedná spíše o vzorky před léčbou protilátkami proti TNF α . Může to být důsledek několika faktorů, např. právě užívané léčby (kortikosteroidů, antirevmatik a dalších) či změny ve stravování. Na konci studie by měl být tento trend více prozkoumán a to i s ohledem na předpokládaný větší počet subjektů ve studii a bližší informace o testovaných subjektech. Ani v jedné z těchto oddělených skupin nejsou přítomny vzorky zdravých dětí, což opět poukazuje na možnost vlivu faktorů specifických u pacientů s JIA a CD v těchto oddělených clusterech.

Kontrolní skupina vykazuje podobné složení bakteriomu, jako bylo popsáno ve studiích (Faith et al. 2013; Qin et al. 2010). Na úrovni rodu jsou zde také relativně hojně zastoupeny rody *Faecalibacterium* (zahrnující *Faecalibacterium prausnitzii*), *Akkermansia* či *Blautia*, což jsou bakterie typické pro zdravé jedince (Tan et al. 2014).

Skupiny JIA poskytují podobné relativní složení bakteriomu jako zdravé skupiny. Rozdíl je znatelný na úrovni čeledi/rodu, kde specificky u skupin JIA je vyšší zastoupení

čeledi *Prevotellaceae*. Tento jev popisuje i nedávná studie (Alpizar-Rodriguez et al. 2019) zkoumající výskyt *Prevotella copri* (rod *Prevotella_9* podle databáze SILVA) u preklinických a nově diagnostikovaných pacientů s revmatoidní artritidou. Podle této studie se zdá, že vysoká hojnost této bakterie ve střevním bakteriomu by mohla znamenat i predispozici k revmatickému onemocnění.

Výrazně odlišné složení bakteriomu na všech testovaných úrovních mají skupiny pacientů s CD. Rozdíly ve složení oproti kontrolní skupině se prohlubují u skupiny CD po podání anti-TNF α , což opět může nasvědčovat tomu, že je to spíše důsledek těžkých forem CD, u kterých léčba ještě nezabrala. Na úrovni rodu je zde znatelný pokles bakterií *Bacteroides* a *Faecalibacterium*, jejíž druh *F. prausnitzii* vykazuje protizánětlivé účinky. Vzrůst vykazuje hlavně rod *Escherichia* a dále rod *Veillonella* a *Blautia*. Námi zjištěné změny v bakteriomu jsou obdobné těm, které již jsou popsány v předchozích studiích o CD (Darfeuille-Michaud et al. 2004; Gevers et al. 2014). Vysoký podíl *E. coli* může souviset s výskytem adherentně invazivní formy *E. coli*, která je podle studie u pacientů s CD přítomna v ileálních vzorcích ve 36 % případů oproti 6 % u kontrol (Darfeuille-Michaud et al. 2004). Z materiálů v naší studii by bylo teoreticky možné toto prokázat i bez použití kultivačních metod, a to metagenomickým či dokonce metatranskriptonovým sekvenováním a hodnocením kandidátních genů charakteristických právě pro adherentně invazivní kmeny, ačkoli na jasných genetických markerech zatím shoda chybí (Zhang et al. 2015).

Studie Png et al. (2010) poukázala na vyšší přítomnost bakterií *Ruminococcaceae* u pacientů s CD, mezi nimiž jsou bakterie schopné degradovat mucinovou vrstvu chránící před adhezí patogenů. Naše výsledky ale žádnou podobnou asociaci neukazují, protože podíl této čeledi u CD oproti zdravým kontrolám je nižší. Nárůst zastoupení rodu *Blautia* je poměrně překvapivý, protože se jedná o jednoho z producentů SCFA, které mají protizánětlivé účinky, podílejí se na výživě enterocytů a na udržení integrity střevní sliznice.

Tato diplomová práce byla vytvořena na základě stále probíhající studie. Jedná se o předběžné výsledky; pacienti jsou nadále rekrutováni, jejich osud se vyvíjí, někteří progredují k podání terapie anti-TNF α , jiní již tuto terapii mají a jejich klinický stav se mění. Pro analýzy na konci studie bude nutné zejména podrobněji definovat stav pacientů v jednotlivých skupinách, včetně jejich dosavadní léčby, dietních opatřeních apod. Dále

bude nutné do analýz zahrnout faktor času – metody pro opakované vzorky odebírané od těchto subjektů jsou ovšem komplikované. Alternativou by mohlo být například hodnotit v podstudii pouze vzorky tři měsíce před a tři měsíce po léčbě anti-TNF α , aby mohl být sledován a posuzován bezprostřední vliv této léčby na střevní bakteriom u obou skupin. To vzhledem k nízkému počtu subjektů (hlavně u skupiny JIA) splňujících tato kritéria nebylo v současné předběžné analýze možné. Analýzy (obzvláště alfa diverzita) by měly být sledovány po jednotlivých měsících léčby, aby byl vidět rozdíl po prvním, druhém a třetím měsíci léčby, jako je tomu ve studii Aden et al. (2019).

Díky identifikaci konkrétních bakteriálních taxonů, které by byly shodně identifikovány v několika studiích, by mohla být terapie u pacientů s Crohnovou chorobou zaměřena specificky na tyto taxony. Některé terapeutické přístupy se snaží modifikovat složení mikrobiomu již v současné době. Diskutuje se například vliv probiotik na Crohnovu chorobu. Jejich nevýhodou je úzký profil použitých bakterií, kde převládají zejména různé kmeny bifidobakterií a laktobacilů. Podle nejnovějších léčebných metodik není používání probiotik k navození remise doporučováno (Limketkai et al. 2020; Su et al. 2020). Potenciální metodou modifikace mikrobiomu u CD je fekální transplantace. Ta je v praxi používána u kolitidy vyvolané bakterií *Clostridium difficile* (Beneš et al. 2014), ale v souvislosti s Crohnovou chorobou byly provedeny jen jednotky studií. Jednou z nich je studie autorů Suskind et al. (2015), která popisuje možný pozitivní vliv na navození remise u pacientů s CD.

V souvislosti s predikcí tohoto onemocnění by bylo nasnadě sledovat v rámci longitudinální studie blízké příbuzné pacientů s Crohnovou chorobou (zejména třeba sourozence), u kterých je vyšší pravděpodobnost výskytu tohoto onemocnění, a definovat tak u nově diagnostikovaných jedinců vývoj složení střevního mikrobiomu před a po diagnóze. Mohlo by tak být objasněno, jestli dysbióza mikrobiomu je příčina, anebo důsledek této choroby, popřípadě definovat taxony, které se u těchto nově diagnostikovaných pacientů specificky vyskytují v jiné hojnosti oproti zdravým jedincům. Jednalo by se o dlouhodobou studii, ve které by nasbírané vzorky mohly být zpracovávány a analyzovány pouze u pacientů, u nichž se nemoc projeví.

Stále nedostatečný je počet studií slizniční mikrobioty získaných z biopsií, které podle dostupných informací (Tap et al. 2017) poskytují odlišné složení mikrobiomu než vzorky stolice. Vzorky biopsie střevní sliznice vykazují nižší alfa diverzitu, nižší podíl

bakterií kmene Firmicutes a Actinobacteria a vyšší podíl bakterií kmene Bacteroidetes a Proteobacteria oproti vzorkům stolice. Nevýhodou je invazivnost odběru sliznice oproti odběrům stolice, ale mohly by být získány přesnější poznatky o složení střevního mikrobiomu.

8 Souhrn

Byly připraveny celkem tři sekvenační knihovny, na jejichž základě byly získány data pro další analýzy.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že:

- Profily bakteriomů vzorků stolice pacientů s Crohnovou chorobou vykazují rozdílnou míru alfa diverzity. Ta u nich klesá po podání léčby anti-TNF α .
- Pacienti s Crohnovou chorobou mají jiné relativní složení bakteriomu oproti zdravým dětem či oproti pacientům léčícím se s juvenilní idiopatickou artritidou.
- V bakteriomu u skupiny pacientů s Crohnovou chorobou je větší zastoupení čeledi *Enterobacteriaceae*, které je odrazem zvýšeného zastoupení zejména rodu *Escherichia*. Navíc je zřejmé, že po podání anti-TNF α se podíl těchto skupin zvyšuje.
- Relativní složení bakteriomu u JIA je podobné jako u kontrolní skupiny zdravých dětí.
- Vliv léčby anti-TNF α na složení bakteriomu u skupiny JIA nelze na základě dosavadních dat posoudit.

9 Seznam použité literatury

- Abrahamsson, T. R., H. E. Jakobsson, A. F. Andersson, B. Björkstén, L. Engstrand, and M. C. Jenmalm. 2014. “Low Gut Microbiota Diversity in Early Infancy Precedes Asthma at School Age.” *Clinical and Experimental Allergy* 44(6):842–50.
- Aden, Konrad, Ateequr Rehman, Silvio Waschina, Wei Hung Pan, Alesia Walker, Marianna Lucio, Alejandro Mena Nunez, Richa Bharti, Johannes Zimmerman, Johannes Bethge, et al. 2019. “Metabolic Functions of Gut Microbes Associate With Efficacy of Tumor Necrosis Factor Antagonists in Patients With Inflammatory Bowel Diseases.” *Gastroenterology* 157(5):1279-1292.e11.
- Aghighi, Y., Modarres Gilani Sh, M. Razavi, A. Zamani, and Kh Daneshjoo. 2007. “Juvenile Rheumatoid Arthritis in Children with Epstein Barr Virus Infection.” *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(20):3638–43.
- Ahluwalia, Bani, Luiza Moraes, Maria K. Magnusson, and Lena Öhman. 2018. “Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Mechanisms of Biological Therapies.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 53(4):379–89.
- Alpizar-Rodriguez, Deshira, Till Robin Lesker, Achim Gronow, Benoît Gilbert, Elena Raemy, Celine Lamacchia, Cem Gabay, Axel Finckh, and Till Strowig. 2019. “Prevotella Copri in Individuals at Risk for Rheumatoid Arthritis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 78(5):590–93.
- Atreya, Raja, Michael Zimmer, Brigitte Bartsch, Maximilian J. Waldner, Imke Atreya, Helmut Neumann, Kai Hildner, Arthur Hoffman, Ralf Kiesslich, Andreas D. Rink, et al. 2011. “Antibodies against Tumor Necrosis Factor (TNF) Induce T-Cell Apoptosis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases via TNF Receptor 2 and Intestinal CD14+ Macrophages.” *Gastroenterology* 141(6):2026–38.
- Barut, Kenan, Amra Adrovic, Sezgin Şahin, and Özgür Kasapçopur. 2017. “Juvenile Idiopathic Arthritis.” *Balkan Medical Journal* 34(2):90–101.
- Beneš, Jiří, Petr Husa, Otakar Nyč, and Sylvia Polívková. 2014. “Doporučený Postup Diagnostiky a Léčby Kolitidy Vyvolané Clostridium Difficile.” Retrieved (<https://www.infekce.cz/dpCDI14.htm>).

- Bernstein, B. H., B. H. Singsen, K. K. King, and V. Hanson. 1977. "Aspirin-Induced Hepatotoxicity and Its Effect on Juvenile Rheumatoid Arthritis." *American Journal of Diseases of Children (1960)* 131(6).
- Bernstein, Charles N., Leanne L. Seeger, James W. Sayre, Peter A. Anton, Lucy Artinian, and Fergus Shanahan. 1995. "Decreased Bone Density in Inflammatory Bowel Disease Is Related to Corticosteroid Use and Not Disease Diagnosis." *Journal of Bone and Mineral Research* 10(2):250–56.
- Beukelman, Timothy, Nivedita M. Patkar, Kenneth G. Saag, Sue Tolleson-Rinehart, Randy Q. Cron, Esi Morgan DeWitt, Norman T. Ilowite, Yukiko Kimura, Ronald M. Laxer, Daniel J. Lovell, Alberto Martini, C. Egla Rabinovich, and Nicolino Ruperto. 2011. "2011 American College of Rheumatology Recommendations for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Initiation and Safety Monitoring of Therapeutic Agents for the Treatment of Arthritis and Systemic Features." *Arthritis Care & Research* 63(4):465–82.
- Biagi, Elena, Lotta Nylund, Marco Candela, Rita Ostan, Laura Bucci, Elisa Pini, Janne Nikkila, Daniela Monti, Reetta Satokari, Claudio Franceschi, Patrizia Brigidi, and Willem de Vos. 2010. "Through Ageing, and beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians." *PLoS ONE* 5(5).
- Borcard, Daniel, Francois Gillet, and Pierre Legendre. 2018. *Numerical Ecology with R*. Second edi. Springer International Publishing AG.
- Britton, Graham J., Eduardo J. Contijoch, Ilaria Mogno, Olivia H. Vennaro, Sean R. Llewellyn, Ruby Ng, Zhihua Li, Arthur Mortha, Miriam Merad, Anuk Das, et al. 2019. "Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t⁺ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice." *Immunity* 50(1):212-224.e4.
- Brotherton, Carol S., Christopher A. Martin, Millie D. Long, Michael D. Kappelman, and Robert S. Sandler. 2016. "Avoidance of Fiber Is Associated with Greater Risk of Crohn's Disease Flare in a 6 Month Period." *Clin Gastroenterol Hepatol* 14 (8):1130–36.

- Buisine, Marie Pierre, Pierre Desreumaux, Virginie Debailleul, Luc Gambiez, Karel Geboes, Nadine Ectors, Marie Paule Delescaut, Pierre Degand, Jean Pierre Aubert, Jean Frédéric Colombel, and Nicole Porchet. 1999. "Abnormalities in Mucin Gene Expression in Crohn's Disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 5(1):24–32.
- Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, and Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13(7):581–83.
- Consolaro, Alessandro, Giorgia Negro, Maria Chiara Gallo, Giulia Bracciolini, Cristina Ferrari, Benedetta Schiappapietra, Angela Pistorio, Francesca Bovis, Nicolino Ruperto, Alberto Martini, et al. 2014. "Defining Criteria for Disease Activity States in Nonsystemic Juvenile Idiopathic Arthritis Based on a Three-Variable Juvenile Arthritis Disease Activity Score." *Arthritis Care & Research* 66(11):1703–9.
- Consolaro, Alessandro, Nicolino Ruperto, Anna Bazso, Angela Pistorio, Silvia Magni-Manzoni, Giovanni Filocamo, Clara Malattia, Stefania Viola, Alberto Martini, and Angelo Ravelli. 2009. "Development and Validation of a Composite Disease Activity Score for Juvenile Idiopathic Arthritis." *Arthritis & Rheumatism* 61(5):658–66.
- Darfeuille-Michaud, Arlette, Jérôme Boudeau, Philippe Bulois, Christel Neut, Anne Lise Glasser, Nicolas Barnich, Marie Agnès Bringer, Alexander Swidsinski, Laurent Beaugerie, and Jean Frédéric Colombel. 2004. "High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia Coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease." *Gastroenterology* 127(2):412–21.
- Dominguez-Bello, Maria G., Elizabeth K. Costello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Noah Fierer, and Rob Knight. 2010. "Delivery Mode Shapes the Acquisition and Structure of the Initial Microbiota across Multiple Body Habitats in Newborns." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(26):11971–75.
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J. P. Gayral, and D. Raoult. 2000. "16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 38(10):3623–30.

- Faith, Jeremiah J., Janaki L. Guruge, Mark Charbonneau, Sathish Subramanian, Henning Seedorf, Andrew L. Goodman, Jose C. Clemente, Rob Knight, Andrew C. Heath, Rudolph L. Leibel, Michael Rosenbaum, and Jeffrey I. Gordon. 2013. "The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota." *Science* 341(6141):1237439.
- Ferrell, Emily G., Lori A. Ponder, Lauren S. Minor, Sheila T. Angeles-Han, Christine W. Kennedy, Kelly A. Rouster-Stevens, Mina Rohani-Pichavant, Larry B. Vogler, and Sampath Prahalad. 2014. "Limitations in the Classification of Childhood-Onset Rheumatoid Arthritis." *Journal of Rheumatology* 41(3):547–53.
- Fishman, Daniel, Gary Faulds, Rachel Jeffey, Vidya Mohamed-Ali, John S. Yudkin, Steve Humphries, and Patricia Woo. 1998. "The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) Gene on IL-6 Transcription and Plasma IL-6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis." *Journal of Clinical Investigation* 102(7):1369–76.
- Gabalec, Libor. 2009. "Crohnova Nemoc - Klasifikace, Diagnostika, Léčba a Kvalita Života." *Interní Medicína* 11(1):16–20.
- Gajendran, Mahesh, Priyadarshini Loganathan, Anthony P. Catinella, and Jana G. Hashash. 2018. "A Comprehensive Review and Update on Crohn's Disease." *Disease-a-Month* 64(2):20–57.
- Gevers, Dirk, Subra Kugathasan, Lee A. Denson, Yoshiki Vázquez-Baeza, Will Van Treuren, Boyu Ren, Emma Schwager, Dan Knights, Se Jin Song, Moran Yassour, et al. 2014. "The Treatment-Naïve Microbiome in New-Onset Crohn's Disease." *Cell Host and Microbe* 15(3):382–92.
- Giancane, Gabriella, Alessandro Consolaro, Stefano Lanni, Sergio Davì, Benedetta Schiappapietra, and Angelo Ravelli. 2016. "Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment." *Rheumatology and Therapy* 3(2):187–207.
- Gomollón, Fernando, Axel Dignass, Vito Annese, Herbert Tilg, Gert Van Assche, James O. Lindsay, Laurent Peyrin-Biroulet, Garret J. Cullen, Marco Daperno, Torsten Kucharzik, et al. 2017. "3rd European Evidence-Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management." *Journal of Crohn's and Colitis* 11(1):3–25.

- Havelka, Stanislav, Jozef Hoza, Jiřina Bartůňková, Milan Bayer, Marie Černá, Pavla Doležalová, Kateřina Jarošová, Dana Němcová, Yvona Šulcová, and Pavel Vavřík. 2004. *Revmatologie Období Růstu*. Maxdorf s.r.o.
- Hovde, Øistein and Bjørn A. Moum. 2012. “Epidemiology and Clinical Course of Crohn’s Disease: Results from Observational Studies.” *World J Gastroenterol* 18(15):1723–31.
- Huurre, Anu, Marko Kalliomäki, Samuli Rautava, Minna Rinne, Seppo Salminen, and Erika Isolauri. 2008. “Mode of Delivery - Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity.” *Neonatology* 93(4):236–40.
- Hyams, Jeffrey, James Markowitz, Anthony Otley, Joel Rosh, David Mack, Athos Bousvaros, Subra Kugathasan, M. Pfefferkorn, Vasundhara Tolia, Jonathan Evans, William Treem, Robert Wyllie, Robert Rothbaum, J. del Rosario, Aubrey Katz, Adam Mezoff, M. Oliva-Hemker, Trudy Lerer, and Anne Griffiths. 2005. “Evaluation of the Pediatric Crohn Disease Activity Index: A Prospective Multicenter Experience.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41(4):416–21.
- Cheifetz, Adam S. 2013. “Management of Active Crohn Disease.” *JAMA - Journal of the American Medical Association* 309(20):2150–58.
- Cheng, Shiqiang, Bei Han, Miao Ding, Yan Wen, Mei Ma, Lu Zhang, Xin Qi, Bolun Cheng, Ping Li, Om Prakash Kafle, Xiao Liang, Li Liu, Yanan Du, Yan Zhao, and Feng Zhang. 2020. “Identifying Psychiatric Disorder-Associated Gut Microbiota Using Microbiota-Related Gene Set Enrichment Analysis.” *Briefings in Bioinformatics* 21(3):1016–22.
- IBD working group ESPGHAN. 2005. “Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents: Recommendations for Diagnosis-The Porto Criteria.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41(1):1–7.
- Illumina. 2013. “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System.”

- Jaimés, José Diógenes, Andrea Slavíčková, Jakub Hurych, Ondřej Cinek, Ben Nichols, Lucie Vodolánová, Karel Černý, and Jaroslav Havlík. 2021. “Stool Metabolome-Microbiota Evaluation among Children and Adolescents with Obesity, Overweight, and Normal-Weight Using ¹H NMR and 16S rRNA Gene Profiling” edited by S. L. Ishaq. *PLOS ONE* 16(3):e0247378.
- Jandhyala, Sai Manasa, Rupjyoti Talukdar, Chivkula Subramanyam, Harish Vuyyuru, Mitnala Sasikala, and D. Nageshwar Reddy. 2015. “Role of the Normal Gut Microbiota.” *World Journal of Gastroenterology* 21(29):8836–47.
- Jostins, Luke, Stephan Ripke, Rinse K. Weersma, Richard H. Duerr, and Et Al. 2012. “Host-Microbe Interactions Have Shaped the Genetic Architecture of Inflammatory Bowel Disease.” *Nature* 491(7422):119–24.
- Kalliolias, George D. and Lionel B. Ivashkiv. 2016. “TNF Biology, Pathogenic Mechanisms and Emerging Therapeutic Strategies.” *Nature Reviews Rheumatology* 12(1):49–62.
- Karlsson, Fredrik H., Valentina Tremaroli, Intawat Nookaew, Göran Bergström, Carl Johan Behre, Björn Fagerberg, Jens Nielsen, and Fredrik Bäckhed. 2013. “Gut Metagenome in European Women with Normal, Impaired and Diabetic Glucose Control.” *Nature* 498(7452):99–103.
- Koenig, Jeremy E., Aymé Spor, Nicholas Scalfone, Ashwana D. Fricker, Jesse Stombaugh, Rob Knight, LARGUS T. Angenent, and Ruth E. Ley. 2011. “Succession of Microbial Consortia in the Developing Infant Gut Microbiome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(SUPPL. 1):4578–85.
- Kozich, James J., Sarah L. Westcott, Nielson T. Baxter, Sarah K. Highlander, and Patrick D. Schloss. 2013. “Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the Miseq Illumina Sequencing Platform.” *Applied and Environmental Microbiology* 79(17):5112–20.
- Kruis, W., P. Frič, J. Pokrotnieks, M. Lukáš, B. Fixa, M. Kaščák, M. A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, and J. Schulze. 2004. “Maintaining Remission of Ulcerative Colitis with the Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 Is as Effective as with Standard Mesalazine.” *Gut* 53(11):1617–23.

- Krych, Łukasz, Witold Kot, Katja M. B. Bendtsen, Axel K. Hansen, Finn K. Vogensen, and Dennis S. Nielsen. 2018. "Have You Tried Spermine? A Rapid and Cost-Effective Method to Eliminate Dextran Sodium Sulfate Inhibition of PCR and RT-PCR." *Journal of Microbiological Methods* 144:1–7.
- Van Kuijk, A. W. R., P. Reinders-Blankert, T. J. M. Smeets, B. A. C. Dijkmans, and P. P. Tak. 2006. "Detailed Analysis of the Cell Infiltrate and the Expression of Mediators of Synovial Inflammation and Joint Destruction in the Synovium of Patients with Psoriatic Arthritis: Implications for Treatment." *Annals of the Rheumatic Diseases* 65(12):1551–57.
- Lehmann, Hartwig W., Antje Knöll, Rolf Michael Küster, and Susanne Modrow. 2003. "Frequent Infection with a Viral Pathogen, Parvovirus B19, in Rheumatic Diseases of Childhood." *Arthritis and Rheumatism* 48(6):1631–38.
- Levin, Alon D., Manon E. Wildenberg, and Gijs R. van den Brink. 2016. "Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease." *Journal of Crohn's and Colitis* 10(8):989–97.
- Limketkai, Berkeley N., Anthony K. Akobeng, Morris Gordon, and Akinlolu Adedayo Adepoju. 2020. "Probiotics for Induction of Remission in Crohn's Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020(7).
- Ma, Jingran, Zhenghong Li, Wenjuan Zhang, Chunli Zhang, Yuheng Zhang, Hua Mei, Na Zhuo, Hongyun Wang, Lin Wang, and Dan Wu. 2020. "Comparison of Gut Microbiota in Exclusively Breast-Fed and Formula-Fed Babies: A Study of 91 Term Infants." *Scientific Reports* 10(1):1–11.
- Malchow, Helmut A. 1997. "Crohn's Disease and Escherichia Coli: A New Approach in Therapy to Maintain Remission of Colonic Crohn's Disease?" *Journal of Clinical Gastroenterology* 25(4):653–58.
- Mariat, D., O. Firmesse, F. Levenez, V. D. Guimarães, H. Sokol, J. Doré, G. Corthier, and J. P. Furet. 2009. "The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio of the Human Microbiota Changes with Age." *BMC Microbiology* 9:123.

- Martini, Alberto, Angelo Ravelli, Tadej Avcin, Michael W. Beresford, Ruben Burgos-Vargas, Ruben Cuttica, Norman T. Ilowite, Raju Khubchandani, Ronald M. Laxer, Daniel J. Lovell, et al. 2019. "Toward New Classification Criteria for Juvenile Idiopathic Arthritis: First Steps, Pediatric Rheumatology International Trials Organization International Consensus." *Journal of Rheumatology* 46(2):190–97.
- Maslowski, Kendle M., Angelica T. Vieira, Aylwin Ng, Jan Kranich, Frederic Sierro, Di Yu, Heidi C. Schilter, Michael S. Rolph, Fabienne MacKay, David Artis, Ramnik J. Xavier, Mauro M. Teixeira, and Charles R. MacKay. 2009. "Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43." *Nature* 461(7268):1282–86.
- McIntosh, Laura A., Miranda C. Marion, Marc Sudman, Mary E. Comeau, Mara L. Becker, John F. Bohnsack, Tasha E. Fingerlin, Thomas A. Griffin, J. Peter Haas, Daniel J. Lovell, Lisa A. Maier, et al. 2017. "Genome-Wide Association Meta-Analysis Reveals Novel Juvenile Idiopathic Arthritis Susceptibility Loci." *Arthritis and Rheumatology* 69(11):2222–32.
- McMurdie, Paul J. and Susan Holmes. 2013. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data" edited by M. Watson. *PLoS ONE* 8(4):e61217.
- Mignard, S. and J. P. Flandrois. 2006. "16S rRNA Sequencing in Routine Bacterial Identification: A 30-Month Experiment." *Journal of Microbiological Methods* 67(3):574–81.
- Mitrová, Katarína. 2012. "Zánětlivá Střevní Onemocnění u Děti." *Pediatric pro Praxi* 13(6):388–90.
- Moller, Frederik Trier, Vibeke Andersen, Jan Wohlfahrt, and Tine Jess. 2015. "Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011." *American Journal of Gastroenterology* 110(4):564–71.

- Ng, Siew C., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, Subrata Ghosh, Justin C. Y. Wu, Francis K. L. Chan, Joseph J. Y. Sung, and Gilaad G. Kaplan. 2017. "Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies." *The Lancet* 390(10114):2769–78.
- Okamoto, Nami, Shumpei Yokota, Syuji Takei, Yuka Okura, Tomohiro Kubota, Masaki Shimizu, Tomo Nozawa, Naomi Iwata, Hiroaki Umebayashi, Noriko Kinjo, Tomoko Kunishima, Junko Yasumura, and Masaaki Mori. 2019. "Clinical Practice Guidance for Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) 2018." *Modern Rheumatology* 29(1):41–59.
- Oksanen, J., G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlin, P. Minchin, and Etal.. 2019. "Vegan: Community Ecology Package, R Package Version 2.5-6."
- Pascal, Victoria, Marta Pozuelo, Natalia Borrueal, Francesc Casellas, David Campos, Alba Santiago, Xavier Martinez, Encarna Varela, Guillaume Sarabayrouse, Kathleen Machiels, Severine Vermeire, Harry Sokol, Francisco Guarner, and Chaysavanh Manichanh. 2017. "A Microbial Signature for Crohn's Disease." *Gut* 66(5):813–22.
- Petty, R. E., T. R. Southwood, J. Baum, E. Bhattay, D. N. Glass, P. Manners, J. Maldonado-Cocco, M. Suarez-Almazor, J. Orozco-Alcala, and A. M. Prieur. 1998. "Revision of the Proposed Classification Criteria for Juvenile Idiopathic Arthritis: Durban, 1997." *The Journal of Rheumatology* 25(10):1991–94.
- Petty, Ross E., Taunton R. Southwood, Prudence Manners, John Baum, David N. Glass, Jose Goldenberg, Xiaohu He, Javier Orozco-Alcala Jose Maldonado-Cocco, and Patricia Woo and International League of Associations for Rheumatology Anne-Marie Prieur, Maria E Suarez-Almazor. 2004. "International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision, Edmonton, 2001." *The Journal of Rheumatology* (31):390–92.
- Png, Chin Wen, Sara K. Lindén, Kristen S. Gilshenan, Erwin G. Zoetendal, Chris S. McSweeney, Lindsay I. Sly, Michael A. McGuckin, and Timothy H. J. Florin. 2010. "Mucolytic Bacteria with Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment in Vitro Utilization of Mucin by Other Bacteria." *American Journal of Gastroenterology* 105(11):2420–28.

- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, Nicolas Pons, Florence Levenez, Takuji Yamada, et al. 2010. "A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing." *Nature* 464(7285):59–65.
- Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jörg Peplies, and Frank Oliver Glöckner. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools." *Nucleic Acids Research* 41(D1):D590.
- R Core Team. 2018. "R: A Language and Environment for Statistical Computing."
- Ravelli, Angelo and Alberto Martini. 2007. "Juvenile Idiopathic Arthritis." *Lancet* 369(9563):767–78.
- Rigottier-Gois, Lionel. 2013. "Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases: The Oxygen Hypothesis." *ISME Journal* 7(7):1256–61.
- Rutgeerts, P., M. Peeters, M. Hiele, G. Vantrappen, F. Penninx, R. Aerts, R. Kerremans, and K. Goboos. 1991. "Effect of Faecal Stream Diversion on Recurrence of Crohn's Disease in the Neoterminal Ileum." *The Lancet* 338(8770):771–74.
- Sandhu, Bhupinder K., John M. E. Fell, R. Mark Beattie, Sally G. Mitton, David C. Wilson, and Huw Jenkins. 2010. "Guidelines for the Management of Inflammatory Bowel Disease in Children in the United Kingdom." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50 Suppl 1.
- Satsangi, J., M. S. Silverberg, S. Vermeire, and J. F. Colombel. 2006. "The Montreal Classification of Inflammatory Bowel Disease: Controversies, Consensus, and Implications." *Gut* 55(6):749–53.
- Schultz, Michael. 2008. "Clinical Use of E. Coli Nissle 1917 in Inflammatory Bowel Disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 14(7):1012–18.
- Scola, Michael P., Tomoyuki Imagawa, Gregory P. Boivin, Edward H. Giannini, David N. Glass, Raphael Hirsch, et al. 2001. "Expression of Angiogenic Factors in Juvenile Rheumatoid Arthritis: Correlation with Revascularization of Human Synovium Engrafted into SCID Mice." *Arthritis & Rheumatism* 44(4):794–801.

- Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. 2016. "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body." *PLoS Biology* 14(8).
- Sigall-Boneh, Rotem, Tamar Pfeffer-Gik, Idit Segal, Tsili Zangen, Mona Boaz, and Arie Levine. 2014. "Partial Enteral Nutrition with a Crohn's Disease Exclusion Diet Is Effective for Induction of Remission in Children and Young Adults with Crohn's Disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 20(8):1353–60.
- Silverman, E. D., B. Isacovics, D. Petsche, and R. M. Laxer. 1993. "Synovial Fluid Cells in Juvenile Arthritis: Evidence of Selective T Cell Migration to Inflamed Tissue." *Clinical and Experimental Immunology* 91(1):90–95.
- Singh, Vandana, Kunal Maniar, Rajasri Bhattacharayya, and Dibyajyoti Banerjee. 2017. "Public Databases of 16s RRNA: A Current Perspective and Future Implications."
- Stange, E. F., S. P. L. Travis, S. Vermeire, C. Beglinger, L. Kupcinkas, K. Geboes, A. Barakauskiene, V. Villanacci, A. Von Herbay, B. F. Warren, C. Gasche, H. Tilg, Stefan W. Schreiber, J. Schölmerich, and W. Reinisch. 2006. "European Evidence Based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease: Definitions and Diagnosis." *Gut* 55(SUPPL. 1):i1.
- Stelmaszczyk-Emmel, Anna, Teresa Jackowska, Lidia Rutkowska-Sak, Maria Marusak-Banacka, and Maria Walsik. 2012. "Identification, Frequency, Activation and Function of CD4⁺ CD25⁺ HighFoxP3⁺ Regulatory T Cells in Children with Juvenile Idiopathic Arthritis." *Rheumatology International* 32(5):1147–54.
- Strober, Warren, Ivan Fuss, and Peter Mannon. 2007. "The Fundamental Basis of Inflammatory Bowel Disease." *Journal of Clinical Investigation* 117(3):514–21.
- Su, Grace L., Cynthia W. Ko, Premysl Bercik, Yngve Falck-Ytter, Shahnaz Sultan, Adam V. Weizman, and Rebecca L. Morgan. 2020. "AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders." *Gastroenterology* 159(2):697–705.

- Suskind, David L., Mitchell J. Brittnacher, Ghassan Wahbeh, Michele L. Shaffer, Hillary S. Hayden, Xuan Qin, Namita Singh, Christopher J. Damman, Kyle R. Hager, Heather Nielson, and Samuel I. Miller. 2015. "Fecal Microbial Transplant Effect on Clinical Outcomes and Fecal Microbiome in Active Crohn's Disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 21(3):556–63.
- Tan, Jian, Craig Mckenzie, Maria Potamitis, Alison N. Thorburn, Charles R. Mackay, and Laurence Macia. 2014. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease." *Advances in Immunology* 121:91–119.
- Tap, Julien, Muriel Derrien, Hans Törnblom, Rémi Brazeilles, Stéphanie Cools-Portier, Joël Doré, Stine Störsrud, Boris Le Nevé, Lena Öhman, and Magnus Simrén. 2017. "Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome." *Gastroenterology* 152(1):111-123.e8.
- Thierry, Sigrid, Bruno Fautrel, Irène Lemelle, and Francis Guillemin. 2014. "Prevalence and Incidence of Juvenile Idiopathic Arthritis: A Systematic Review." *Joint Bone Spine* 81(2):112–17.
- Torres, Joana, Saurabh Mehandru, Jean-Frédéric Colombel, and Laurent Peyrin-Biroulet. 2017. "Crohn's Disease." *The Lancet* 389:1741–55.
- Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Micah Hamady, Claire M. Fraser-Liggett, Rob Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2007. "The Human Microbiome Project." *Nature* 449(7164):804–10.
- Větrovský, Tomáš and Petr Baldrian. 2013. "The Variability of the 16S RRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses" edited by J. Neufeld. *PLoS ONE* 8(2):e57923.
- Vos, Anne Christine W., Manon E. Wildenberg, Marjolijn Duijvestein, Auke P. Verhaar, Gijs R. Van Den Brink, and Daniel W. Hommes. 2011. "AntiTumor Necrosis Factor- α Antibodies Induce Regulatory Macrophages in an Fc Region-Dependent Manner." *Gastroenterology* 140(1):221-230.e3.

- Wade, W. 2002. "Unculturable Bacteria - The Uncharacterized Organisms That Cause Oral Infections." Pp. 81–83 in *Journal of the Royal Society of Medicine*. Vol. 95. Royal Society of Medicine Press.
- Wallace, Kori L., Li Bo Zheng, Yoshitake Kanazawa, and David Q. Shih. 2014. "Immunopathology of Inflammatory Bowel Disease." *World Journal of Gastroenterology* 20(1):6–21.
- Wang, Yizhong, Xuefeng Gao, Amine Ghazlane, Hui Hu, Xiaolu Li, Yongmei Xiao, Dan Li, Guangjun Yu, and Ting Zhang. 2018. "Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy." *Journal of Crohn's and Colitis* 12(3):337–46.
- Wedderburn, Luxcy R., Nicola Robinson, Alka Patel, Hemlata Varsani, and Patricia Woo. 2000. "Selective Recruitment of Polarized T Cells Expressing CCR5 and CXCR3 to the Inflamed Joints of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 43(4):765–74.
- Winslet, M. C., A. Allan, V. Poxon, D. Youngs, and M. R. B. Keighley. 1994. "Faecal Diversion for Crohn's Colitis: A Model to Study the Role of the Faecal Stream in the Inflammatory Process." Pp. 236–42 in *Gut*. Vol. 35. BMJ Publishing Group.
- Wright, Emily K., Peter De Cruz, Richard Gearry, Andrew S. Day, and Michael A. Kamm. 2014. "Fecal Biomarkers in the Diagnosis and Monitoring of Crohn's Disease."
- Yarza, Pablo, Pelin Yilmaz, Elmar Pruesse, Frank Oliver Glöckner, Wolfgang Ludwig, Karl Heinz Schleifer, William B. Whitman, Jean Euzéby, Rudolf Amann, and Ramon Rosselló-Móra. 2014. "Uniting the Classification of Cultured and Uncultured Bacteria and Archaea Using 16S rRNA Gene Sequences." *Nature Reviews Microbiology* 12(9):635–45.
- Yokota, Shumpei, Takako Miyamae, Tomoyuki Imagawa, Naomi Iwata, Shigeki Katakura, Masaaki Mori, Patricia Woo, Norihiro Nishimoto, Kazuyuki Yoshizaki, and Tadamitsu Kishimoto. 2005. "Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody in Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 52(3):818–25.

- Zhang, Yuanhao, Leahana Rowehl, Julia M. Krumsiek, Erika P. Orner, Nurmohammad Shaikh, Phillip I. Tarr, Erica Sodergren, George M. Weinstock, Edgar C. Boedeker, Xuejian Xiong, John Parkinson, Daniel N. Frank, Ellen Li, and Grace Gathungu. 2015. "Identification of Candidate Adherent-Invasive E. Coli Signature Transcripts by Genomic/Transcriptomic Analysis." *PLoS ONE* 10(6).
- Zhao, William, Hsi en Ho, and Supinda Bunyavanich. 2019. "The Gut Microbiome in Food Allergy." *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 122(3):276–82.